Ueber Probleme der alkoholischen Gärung der Aminosäuren im Hinblick auf verschiedene Fragen der technischen Gärbetriebe.

Von der
Technischen Hochschule zu Breslau
zur Erlangung
der Würde eines Doktor-Ingenieurs
genehmigte
Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Ing. RUDOLF OTTO
aus Gleiwitz

Referent:
Prof. Dr. F. Ehrlich

Korreferent:
Prof. Dr. F. Straus

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 1927

BRESLAU 1927

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Unter den Gärungsnebenerzeugnissen sind die bei weitem wichtigsten die Fuselöle, die bei der Raffination des Rohspiritus in den Kartoffel-, Getreide- und Melassebrennereien aus diesem abgeschieden und für sich gewonnen werden. Sie stellen farblose bis bräunlich gelbe Flüssigkeiten von unangenehmem Geruch dar, die zum größten Teil aus höheren Alkoholen der Fettreihe, besonders aus Amylalkohol, ferner aus Butyl- und Propylalkohol bestehen.

Diese Gärungsnebenprodukte waren seit ihrer Entdeckung durch den schwedischen Chemiker Scheele im Jahre 1785 bis vor wenigen Jahrzehnten den Brennereien sehr lästig und unerwünscht, da sie als stete Begleiter des Branntweins infolge ihrer gesundheitsschädlichen Wirkungen dessen Qualität in empfindlicher Weise ungünstig beeinflußten. Unter Fusel verstand man daher früher jeden schlechten Branntwein, und man verwendet den Begriff heute noch vielfach im gleichen Sinne. Aber auch in manchen anderen Gewerben werden schlechte und minderwertige Produkte in übertragenem Sinne als Fusel bezeichnet, so spricht man z. B. in manchen Gegenden von einem wenig wertvollen, unansehnlichen „Fuselobst".

Allmählich hatte man jedoch die vielfachen Verwendungsmöglichkeiten des anfangs verschmähten Fuselöls und seiner Bestandteile für die verschiedensten technischen Zwecke kennen gelernt. Es vollzog sich daher sehr bald ein vollkommener Umschwung in der Bewertung dieses bis dahin verkannten Abfallproduktes der Spritfabriken, deren Aufgabe bekanntlich die Reinigung oder Raffination des Rohspiritus bildet. Aus dem früher als schädlich und lästig angesehenen Nebenerzeugnis wurde mit der Zeit das wertvollste Erzeugnis der Brennerei, dessen Handelspreis sogar den des Hauptproduktes, des Alkohols selbst, schließlich weit übertraf.

In früheren Jahren erfolgte die Rektifikation des Spiritus ausschließlich in den Spiritusraffinerien. Diese verschnitten die noch verunreinigten Rohsprite der landwirtschaftlichen Kartoffel- und Maisbrennereien und der gewerblichen Melassebrennereien, verdünnten sie, filtrierten sie über Kohle aus weichem, harzfreiem Linden- oder Weidenholz und unterwarfen das Filtrat der fraktionierten Destillation. Dadurch wurden die folgenden vier Produkte erhalten: 1. Der Vorlauf, bestehend aus einem Gemisch von Aethylalkohol und Acetaldehyd. 2. Der Feinsprit, der die mittleren,

reinsten und feinsten Produkte der Rektifikation enthält. 3. Der Nachlauf, der schon durch höher siedende Alkohole verunreinigt ist und 4. das Fuselöl.

Heutzutage wird Rohbranntwein fast nur noch in den steuerlich begünstigten landwirtschaftlichen Kartoffel- und Maisbrennereien hergestellt. In der Mehrzahl der gewerblichen Brennereien jedoch ist man dazu übergegangen, in besonders konstruierten Destillierapparaten, wie den Feinspritautomaten von Christoph, Heckmann, Ilges und Pampe hochprozentigen Spiritus von 93 und mehr Gewichtsprozenten direkt aus der Maische zu erzeugen, und das Fuselöl abzuscheiden, um dadurch die Rentabilität der betreffenden Brennereibetriebe zu heben. Besonders mag dazu die Tatsache beigetragen haben, daß die Monopolverwaltung erstmalig in der Kampagne 1925/26 die Anforderung stellte, daß der Spiritus möglichst fuselfrei und hochprozentig sein mußte, anderenfalls sie einen erheblich geringeren Preis zahlte. Die Brennereien haben also dadurch erstens den Vorteil der besseren Bezahlung des von ihnen abzuliefernden Spiritus und zweitens den Gewinn aus dem Verkauf des erheblich teureren Fuselöls.

Die Verwendungsmöglichkeiten dieses wertvollen Gärungsnebenproduktes sind sehr vielseitig. Sein Hauptbestandteil, der Amylalkohol, ist in der chemischen Technik, besonders in der Lack- und Fettindustrie, direkt oder in Form des Amylacetats ein vielbenutztes Lösungsmittel geworden. In der Nitrozelluloseindustrie wird er zur Herstellung des rauchlosen Pulvers verwendet. Außerdem wird er auf Amylacetat, sowie eine weitere Reihe von Amylestern verarbeitet, die zur Bereitung von Bonbons, Limonaden, Fruchtäthern und Fruchtaroma dienen. Neuerdings sollen auch bestimmte Stoffe des Fuselöls für besondere Zwecke der Filmindustrie Verwendung finden.

Was die Zusammensetzung der Fuselöle anbetrifft, so unterliegt diese gewissen Schwankungen, die durch die Herkunft des Fuselöls bedingt sind. Der Hauptmenge nach sind darin enthalten die beiden Amylalkohole, Isobutylcarbinol und d-Amylalkohol zu 65—80%, Isobutylalkohol zu 15—25%, n-Propylalkohol zu 4—7%. Ferner finden sich in den Fuselölen in Spuren n-Amylalkohol, freie Fettsäuren, Fettsäureester, Furfurol und Basen.

Ueber die Bildung der Fuselöle, die schon seit langer Zeit Gegenstand wissenschaftlicher Forschung gewesen ist, hat erst zu Anfang dieses Jahrhunderts die Erkenntnis der biochemischen Prozesse, die sich bei der Gärung abspielen, Klarheit geschaffen. Früher hatte man die durch die Hefe bewirkte Ueberführung von Zucker in Alkohol unter Kohlensäureentwickelung lediglich für eine Zersetzung der Kohlehydrate gehalten. Gay-Lussac stellte zuerst im Jahre 1815 auf Grund eingehender quantitativer Gärversuche für den Verlauf der

Gärung folgende chemische Gleichung auf: $C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$, die auch heute noch als Hauptgärungsgleichung ihre Gültigkeit erwiesen hat.

Pasteur und Duclaux fanden aber schon, daß nach dieser Gleichung nur 94—95% des Zuckers bei der Gärung in Alkohol und Kohlensäure zerfallen. Wie wir heute wissen, wird der übrige Teil des Zuckers in Glyzerin und Acetaldehyd übergeführt, und der Rest dient der Hefe als Kohlenstoffmaterial zum Aufbau neuer Körpersubstanz. Lange Zeit nahm man an, daß auch die übrigen Nebenprodukte der Gärung, wie Fuselöl und Bernsteinsäure ihren Ursprung in dem nicht zu Alkohol und Kohlensäure umgesetzten Zucker haben. Man glaubte, daß mehrfach aus Gärmaterialien isolierte Bakterien die Ursache der Bildung von Fuselölen wären, dessen Entstehung aus Kohlehydraten man sogar durch chemische Gleichungen wie die folgende: $5\,C_6H_{12}O_6 = 4\,C_5H_{12}O + 10\,CO_2 + 6\,H_2O$[1]) zu erklären versuchte. Auch späterhin hat man noch lange Zeit angenommen, daß die Stärke oder der Zucker die Grundstoffe der Fuselölbildung seien[2]), wofür man jedoch keinen experimentellen Beweis erbringen konnte.

Erst die im Jahre 1905 einsetzenden Arbeiten von F. Ehrlich[3]) haben Klarheit über die Bildung der Fuselöle bei der alkoholischen Gärung geschaffen. Durch umfangreiche Versuche stellte er fest, daß durch die Lebenstätigkeit der Hefe gewisse Eiweißabbaustoffe, die Aminosäuren, von denen bisher etwa 20 aufgefunden worden sind, in höhere Alkohole umgewandelt werden. Die Aminosäuren, die zum Teil aus der Hefe selbst stammen, finden sich meistens in den zur Gärung verwendeten Rohstoffen in erheblichen Mengen. Sie sind entweder bereits ursprünglich darin vorhanden oder entstehen während der Einmaischung durch hydrolytische Fermente aus dem natürlichen Pflanzenmaterial, das stets Eiweißstoffe in wesentlichen Mengen enthält. Diesen durch die proteolytischen Enzyme der Hefe und des Malzes abgebauten Eiweißstoffen entnimmt die Hefe den für die Bildung neuer Hefezellen und für den Aufbau von neuem Körpereiweiß erforderlichen Stickstoff.

Während man früher annahm, daß die durch die Hefe assimilierten Aminosäuren restlos von dieser aufgenommen und auf Eiweiß verarbeitet werden, wies Ehrlich nach, daß die Hefe nur den Stickstoff in Form von Ammoniak daraus abspaltet, wobei natur-

---

[1]) Märcker: Handbuch der Spiritusfabrikation. 4. Aufl. S. 41, (1886).

[2]) Pringsheim: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 38, 486 (1905). Emmerling: Ber. 37, 3535 (1904); 38, 953 (1905).

[3]) F. Ehrlich: Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerindustrie 55, 539 (1905). Biochem. Zeitschr. 2, 52 (1907). Ber. 39, 4072 (1906). 40, 1027 (1907).

gemäß stickstoffreie Abbausubstanzen zurückbleiben müssen, welche zu einem beträchtlichen Teil die Komponenten des Fuselöls bilden.

Den Beweis dafür, daß die Fuselölbildung tatsächlich auf die Gärung von Aminosäuren zurückzuführen ist, erbrachte Ehrlich dadurch, daß er die Hauptbestandteile des Fuselöls, den inaktiven Isoamylalkohol und den aktiven d-Amylalkohol aus Leucin und Isoleucin, die beide in den Eiweißstoffen sämtlicher Maischen vorhanden sind, durch direkte Vergärung mittels Reinzuchthefe bei Gegenwart von Zucker darstellte.

Außer dem Leucin und dem von F. Ehrlich entdeckten Isoleucin,[4]) die stets beide zusammen vorkommen, kommt als Muttersubstanz des Fuselöls noch eine Aminovaleriansäure, das Valin, in Betracht. Aus diesen drei Aminosäuren spaltet die gärende Hefe unter Wasseranlagerung Kohlendioxyd und Ammoniak ab. Dieser Vorgang wird durch folgende Gleichungen veranschaulicht.

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}=CH\,CH_2\,\dot{C}H(NH_2)\,COOH+H_2O=\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}=CH\,CH_2\,CH_2\,OH+CO_2+NH_3$$

Leucin — Isoamylalkohol

$$\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}=\dot{C}H\,\dot{C}H\,(NH_2)\,COOH+H_2O=\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}=\dot{C}H\,CH_2\,OH+CO_2+NH_3$$

Isoleucin — d-Amylalkohol

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}=CH\,\dot{C}H\,(NH_2)\,COOH+H_2O=\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}=CH\,CH_2\,OH+CO_2+NH_3$$

Valin — Isobutylalkohol

Die die optische Aktivität bedingenden asymmetrischen Kohlenstoffatome sind in den vorstehenden Gleichungen durch einen * gekennzeichnet.

Das bei diesem Vorgang gebildete Ammoniak, das bei der sauren Reaktion der Maischen nicht in die Luft entweichen kann, läßt sich in den gärenden Flüssigkeiten auch nicht spurenweise nachweisen. Es muß also in statu nascendi von den Saccharomyceten zum Aufbau von neuem Körpereiweiß verwendet werden.

Dieser Gärung unterliegen nicht nur die das Fuselöl bildenden Aminosäuren, sondern, wie Untersuchungen von F. Ehrlich[5]) ergeben haben, sämtliche α-Aminomonokarbonsäuren, so daß man für diese alkoholische Gärung der Aminosäuren folgende allgemeine Gärungsgleichung aufstellen kann:

$$R.\,CH(NH_2).\,COOH + H_2O = R.\,CH_2\,OH + CO_2 + NH_3$$

Der biochemische Abbau der Aminosäuren bei dieser Reaktion vollzieht sich nach den Untersuchungen von Neubauer und Fromherz[6]), deren Ergebnisse später auch von C. Neuberg und seinen

---

[4]) F. Ehrlich: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 1809 (1904) 40, 2538 (1907).

[5]) F. Ehrlich: Ber. 44, 139 (1911); 45, 883 (1912).

[6]) Neubauer u. Fromherz: Zeitschr. f. phys. Chemie 70, 326 (1910).

Mitarbeitern[7]) bestätigt worden sind, höchstwahrscheinlich in der Weise, daß zunächst aus den Aminosäuren die Ketosäuren durch Desaminierung hervorgehen, die dann weiterhin durch Kohlensäureabspaltung über die Aldehyde in die entsprechenden Alkohole verwandelt werden:

$$R'.CHNH_2.COOH \rightarrow R.CO.COOH \rightarrow R.CHO + CO_2 \rightarrow R.CH_2OH.$$

Auf Grund seiner Beobachtungen über die Vergärung von Aminosäuren konnte F. Ehrlich ein technisches Verfahren (D. R. P. 177 174) zur Anreicherung von Fuselalkoholen in Brennereimaischen angeben. Durch Zusatz von Leucinen zu Zuckerlösungen, die mit stickstoffarmer Hefe vergoren wurden, konnte er den Fuselölgehalt im Rohspiritus bis auf annähernd 3% treiben, während sonst nur 0,3 bis 0,7% in den technischen Rohbranntweinen enthalten sind.

Da die Fuselölbildung auf den Eiweißstoffwechsel der lebenden Hefe zurückzuführen ist, so muß sich bei jeder durch lebende Hefezellen veranlaßten Gärung Fuselöl bilden. Tatsächlich entsteht dieses Nebenprodukt selbst bei der Vergärung von ganz reinen Zuckerlösungen mit Hefe. Daraus folgt, daß die Hefe bei ungünstigen Vegetationsbedingungen den zum Aufbau von neuem Zelleiweiß erforderlichen Stickstoff ihrem eigenen Körpereiweiß entnimmt, das dabei durch autolytische Zersetzung zu Aminosäuren abgebaut wird und dabei schließlich unter anderen Abbauprodukten auch Fuselöl liefert.

Daß die Fuselölbildung unmittelbar mit dem Eiweißstoffwechsel der lebenden Zelle zusammenhängt, ließ sich weiterhin auch dadurch beweisen, daß Gärungen mit Hefepreßsaft, Acetondauerhefe, oder Hefe, die mit Toluol getötet worden ist, vollständig ohne Bildung von Fuselöl verlaufen[8]), woraus wiederum hervorgeht, daß die Entstehung der höheren Alkohole mit der Zerlegung des Zuckers durch die Zymase nichts zu tun hat.

Setzt man mit lebender Hefe gärenden Maischen Stickstoffverbindungen zu, die den Stickstoff in leicht assimilierbarer Form enthalten, wie z. B. Ammoniakverbindungen, so zeigt es sich, daß die Fuselölbildung dadurch stark beeinflußt wird, da die Hefe in diesem Fall ihren Stickstoffbedarf für den Eiweißaufbau anderweitig decken kann und eine entsprechende Menge Aminosäuren unberührt läßt. Die Bildung von Nebenprodukten bei allen natürlichen und technischen Gärprozessen muß also wesentlich von der Stickstoffernährung der Hefe abhängen.

In Anbetracht der großen Bedeutung, die die Fuselöle, besonders der Amylalkohol für viele technische Zwecke haben, schien es von Interesse, Fuselöle verschiedener Fabriken durch fraktionierte

---

[7]) Neuberg u. Kerb: Biochem. Zeitschr. 47, 413 (1912). Neuberg Biochem. Zeitschr. 71, 83 (1915).

[8]) F. Ehrlich: Ber. 39, 4072 (1906).
H. Pringsheim: Biochem. Zeitschrift 3, 266 (1907).

Destillationen und polarimetrisch zu untersuchen, und die dadurch ermittelte Zusammensetzung der Fuselöle zu der in den verschiedenen Fabriken üblichen Zusammensetzung der Maischen und der gebräuchlichen Arbeitsverfahren in Beziehung zu bringen. Weiterhin mußte es reizvoll erscheinen, in Weiterführung der früheren Versuche F. Ehrlichs, gesetzmäßige Beziehungen zwischen Stickstoffernährung der Hefe, sowie Ausbeuten an Fuselöl und Alkohol festzulegen, die für die Praxis der technischen Gärbetriebe von Wert sein konnten.

Die zu diesem Zwecke von mir angestellten Untersuchungen gliedern sich in folgende Hauptabschnitte:

I. Untersuchung verschiedener Melassefuselöle aus Melassepreßhefefabriken und Brennereien, besonders in Hinsicht auf die Mengenverhältnisse von inaktiven Isoamylalkohol und optisch aktivem d-Amylalkohol. Beziehungen zwischen ihrer Zusammensetzung und der Arbeitsweise der Fabriken. Isolierung des normalen Amylalkohols.

II. Fuselölbildung bei der Melassegärung unter Zusatz verschiedener anorganischer Stickstoffverbindungen.

III. Fuselölbildung bei der Melassegärung unter Zusatz anorganischer und organischer Stickstoffverbindungen, für sich und im Gemisch, mit und ohne Lüftung.

IV. Gärversuche mit Melasse unter Zusatz von autolysierter Bierhefe und mittels verschiedener Heferassen. Untersuchung von Bier auf Fuselölgehalt.

V. Gärversuche mit reinem Zucker unter Zusatz von Leucin zur Erzielung einer maximalen Ausbeute an Fuselöl im Rohspiritus.

VI. Beeinflussung der Fuselölbildung durch Asparaginsäure. Asymmetrische Spaltung von racemischer Asparaginsäure durch Hefegärung bei Zusatz von vitaminhaltigem Nährsubstrat. Darstellung von optisch reiner d-Asparaginsäure.

I. Untersuchung verschiedener Melassefuselöle aus Melassepreßhefefabriken und Brennereien, besonders in Hinsicht auf die Mengenverhältnisse von inaktivem Isoamylalkohol und optisch aktivem d-Amylalkohol. Beziehungen zwischen ihrer Zusammensetzung und der Arbeitsweise der Fabriken. Isolierung des normalen Amylalkohols.

Ueber die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fuselöle liegen in der chemischen Literatur eine Reihe von Angaben vor. Die älteren, die zum größten Teil aus der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts stammen, sind 1892 übersichtlich von K. Windisch[9]) zusammengefaßt worden. Da seit Ende des vorigen Jahrhunderts auf Grund der Forschungen, besonders von Hansen und Delbrück über natürliche Hefereinzucht, die Gärungstechnik auf einer anderen, wesentlich verbesserten Grundlage arbeitet, können zu vergleichenden Betrachtungen nur die neueren Arbeiten von Windisch[9]), Kruis und Raymann[10]) und Marckwald[11]) herangezogen werden. Nach diesen weist die Zusammensetzung der Fuselöle je nach ihrer Herkunft große Verschiedenheiten auf.

Ein anschauliches Bild von der verschiedenartigen Zusammensetzung, sogar von Fuselölen aus demselben Rohmaterial, geben die nachstehenden, den Arbeitern von Windisch, Kruis und Raymann und E. Morin[12]) entnommenen Analysenzahlen. Morin gibt in der Originalarbeit die Menge der aus 100 Liter Kognak isolierten Fuselbestandteile an. Zum Vergleich sind in der nachstehenden Tabelle diese Werte auf Prozentzahlen von Fuselöl umgerechnet worden.

---

[9]) K. Windisch: „Ueber die Zusammensetzung der Trinkbranntweine". Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. VIII (1892).

[10]) Mitteilungen der Versuchsstation für Spiritusindustrie in Prag. 1894, Heft II.

[11]) Markwald: Ber. 34, 479; 485 (1901). 35, 1595 (1902).

[12]) E. Morin: Compt. rend. Acad. Sciences, 105, 1019 (1888).

Zusammensetzung der Hauptbestandteile von Fuselölen aus:

	Korn nach Windisch	Kartoffelspiritus nach Windisch	Kartoffelspiritus nach Kruis u. Raymann	Kognak nach Morin
Aethylalkohol	—	—	4,9%	—
n-Propylalkohol	3,7%	6,9%	0,1%	11,6%
Isobutylalkohol	15,8%	24,4%	0,4%	2,7%
Amylalkohol	79,9%	68,8%	94,2%	81,6%

Briem[13]) untersuchte ein „Fuselöl" aus Rübenspiritus und fand darin 89% Aethyl- und Propylalkohol, 9% Butylalkohol und nur 2% Amylalkohol. Offenbar handelte es sich hierbei nur um einen mit viel Fuselöl verunreinigten Rohsprit.

Bis auf den schon älteren, abnormen Briemschen Analysenbefund geht aus den Untersuchungen mit Sicherheit hervor, daß der Amylalkohol stets den Hauptbestandteil des Fuselöls bildet. Dieser Amylalkohol ist aber in keinem Fall ein einheitliches Produkt, sondern liegt in sämtlichen Fuselölen als ein wechselndes Gemenge zweier strukturisomerer Verbindungen vor. Es sind dieses:

Der Isoamylalkohol CH_3 (Isobutylcarbinol) CH_3 $= CH\ CH_2\ CH_2\ OH$ und der

optisch aktive d-Amylalkohol CH_3 (Methyläthylcarbincarbinol) C_2H_5 $= \dot{C}H\ CH_2\ OH$

Die optische Aktivität der letzteren Verbindung ist auf die Asymmetrie des mit einem * versehenen Kohlenstoffatomes zurückzuführen.

Die vollständige Trennung dieser beiden Isomeren ist erst im Jahre 1901 W. Markwald gelungen. Dieser fand für das spezifische Drehungsvermögen des reinsten d-Amylalkohols den Wert $[\alpha]_D = -5{,}90°$. Weitere Untersuchungen dieses Forschers ergaben, daß in dem Gärungsamylalkohol aus Getreide-, Kartoffel- und Melassefuselöl die Mengenverhältnisse der beiden isomeren Amylalkohole charakteristische Unterschiede aufweisen. Den bei weitem höchsten Gehalt an d-Amylalkohol mit 48 bis 58% hatte der aus Melassefuselölen isolierte Amylalkohol, während solche aus Getreide- und Kartoffelfuselölen nur 13,5 bis 22% d-Amylalkoholgehalt aufwiesen.

---

[13]) Briem: Die Rübenbrennerei, S. 117, Verlag A. Hartleben, Wien (1888).

Aus diesem Grunde hat Marckwald in seinen ausgezeichneten Arbeiten für die Herstellung des reinsten d-Amylalkohols in erster Linie das Melassefuselöl bevorzugt, und viele Jahre hindurch hat man dieses benutzt, um nach dem Marckwaldschen Trennungsgang eine große Anzahl wertvoller, optisch aktiver Verbindungen zu erhalten, die sich vom d-Amylalkohol ableiten.

Besonders auffallend war, daß in dem Gemisch der Amylalkohole aus Melassefuselöl ungefähr gleiche Mengen Iso- und d-Amylalkohol sich vorfanden, während Getreide- und Kartoffelfuselöl nur ungefähr zu einem Fünftel aus d-Amylalkohol, die übrigen vier Fünftel aber aus inaktivem Isoamylalkohol bestanden. Diese eigentümliche Tatsache hat dann F. Ehrlich 1905 nach Entdeckung des Isoleucins als Bestandteil des Eiweiß zu Untersuchungen geführt, die eine endliche Aufklärung über die Entstehung des Fuselöls brachten. Dabei ließ sich, wie schon erwähnt, zeigen, daß die beiden Amylalkohole aus den beiden Leucinen des Eiweiß hervorgehen und es war besonders bemerkenswert, daß die Mengenverhältnisse von Leucin und Isoleucin in der mit Strontian entzuckerten Melasse denen der Amylalkohole im Melassefuselöl fast genau entsprachen, indem auch im Rohprodukt von der Ursprungssubstanz des d-Amylalkohols, dem Isoleucin, fast genau die gleiche Menge vorhanden war, wie von dem Leucin, der Muttersubstanz des inaktiven Amylalkohols.

Bei Versuchen, optisch aktive Verbindungen aus d-Amylalkohol herzustellen, war es nun im Institut für Biochemie und landwirtschaftliche Technologie der Universität Breslau wiederholt aufgefallen, daß das Melassefuselöl des Handels ein sehr schwankendes Drehungsvermögen besaß, und daß es in den letzten Jahren überhaupt nicht möglich war, Melassefuselöl von auch nur annähernd so hohem Drehungsvermögen der Amylalkoholgemische, wie es in früheren Jahren Marckwald gefunden hat, zu beziehen.*)

Diese gelegentlichen Betrachtungen gaben mir nun Veranlassung, systematische Untersuchungen darüber anzustellen, ob und in welchem Grade in den letzten Jahren tatsächlich eine Veränderung in der Zusammensetzung der Melassefuselöle eingetreten ist, und inwieweit diese sich durch die verschiedene Zusammensetzung der Brennereimaischen und durch die Verschiedenheit der angewandten Gärverfahren oder andere Umstände erklären lassen.

Auf Grund seiner Untersuchungen hat Marckwald schon 1902 angenommen, daß Unterschiede in der Zusammensetzung der Fuselöle, besonders in Hinsicht auf ihren wechselnden Gehalt an den beiden Amylalkoholen nicht nur auf die Verschiedenheit der Ausgangsmaterialien, sondern auch auf Verschiedenheiten der Gärführung zurückzuführen sein müßten.

*) Nach schriftlichen Mitteilungen an Professor Ehrlich hat auch Professor Marckwald ähnliche Beobachtungen gemacht.

Ich habe mich deshalb mit einer großen Anzahl von Gärbetrieben in Verbindung gesetzt und sowohl aus Melassebrennereien, als auch aus Preßhefefabriken, die mit Melassemaischen arbeiten, die abfallenden Fuselöle bezogen und diese auf ihre Zusammensetzung untersucht. Es wurden mir Melassefuselöle von 5 Melassebrennereien und 7 Melasse verarbeitenden Preßhefefabriken zur Verfügung gestellt. Aus den einzelnen Fuselölproben wurden durch wiederholte sorgfältig durchgeführte fraktionierte Destillationen vor allen Dingen die Amylalkoholgemische abgeschieden und polarimetrisch auf ihren Gehalt an d-Amylalkohol untersucht.

Die erhaltenen Werte sind in den Tabellen 1 und 2 verzeichnet. Diese Tabellen enthalten gleichzeitig auch, soweit es mir möglich war, darüber Aufschluß zu erlangen, Angaben über die Arbeitsweise der betreffenden Betriebe, die ich den Fabrikbesitzern oder Betriebsleitern verdanke. Die in dieser Hinsicht von mir eingeholten Auskünfte beziehen sich in erster Linie auf die Art und Menge der Stickstoffernährung der Maischen.

Wenn auch einzelne dieser Angaben recht unvollständig und dürftig erscheinen, so ist doch hiermit zum ersten Mal ein Einblick in die Beziehungen zwischen der Zusammensetzung der Fuselöle und der Stickstoffdüngung der Maischen gegeben, der für viele praktische Fragen Bedeutung erlangen kann.

Zur Erläuterung der Tabellen sei erwähnt, daß die Bezeichnung der Fuselöle, da die Fabriken zum Teil die Nennung ihres Namens nicht wünschten, mit den römischen Ziffern I bis XII vorgenommen wurde. Wenn von ein und derselben Fabrik mehrere Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen waren, so wurde die römische Ziffer mit einem entsprechenden Index von kleinen lateinischen Buchstaben versehen (z. B. Ia, Ib, Ic). Tabelle 1 enthält die aus Melassespiritusfabriken stammenden Fuselöle, Tabelle 2 die aus Preßhefefabriken, die mit Melassemaischen arbeiten.

Bei dem Vergleich der beiden Tabellen fällt zunächst auf, daß schon das optische Drehungsvermögen der mit Kaliumcarbonat entwässerten Fuselöle erhebliche Abweichungen aufweist. Die Drehungen im 2 dcm-Rohr schwanken bei den Brennereifuselölen zwischen —2,08° und —3,30°, während sie sich bei den Fuselölen aus den Preßhefefabriken nur zwischen —1,04° und —1,94° bewegen. Daraus geht schon hervor, daß die in den Hefefabriken abfallenden Fuselöle erheblich weniger d-Amylalkohol enthalten, als die der Brennereien.

Noch deutlicher treten diese Unterschiede bei der Drehung der aus den Fuselölen isolierten Amylalkoholfraktionen in Erscheinung. Sie schwanken bei den aus Brennereien stammenden Fuselölen zwischen —2,91° und —4,34° (1 = 2), woraus sich der d-Amylalkoholgehalt zu 30,06 bis 45,04% ergibt. Bei den neun Fuselölproben aus Hefefabriken erreichten die gefundenen Drehungswerte nur — 1,77%

bis $-2{,}32^0$ (1 = 2). Daraus errechnet sich der Gehalt an d-Amyl alkohol zu 18,38 bis 24,12%. Vergleicht man noch die von einigen Fabriken vorliegenden Angaben über die Ausbeuten an Fuselöl, so zeigt es sich, daß dieselben im allgemeinen *) in den Melassebrennereien größer sind.

Die sämtlichen Unterschiede sind durch die Zusammensetzung der Maischen und die Arbeitsweise der Fabriken erklärlich. Die Melassen enthalten im Durchschnitt 2% Stickstoff in der Trockensubstanz. Die Menge und Art der Stickstoffsubstanzen ist allerdings Schwankungen unterworfen, die auf die Beschaffenheit und Düngung des Bodens, auf dem die Zuckerrüben gewachsen sind, auf die Reife der Rüben, das Klima, die Regenmenge und zum Teil auch auf die Arbeitsweise der Zuckerfabriken zurückzuführen sind.

Nur ein Teil der Stickstoffkörper der Melasse ist für die Hefe assimilierbar. 20 bis 40% der gesamten Stickstoffsubstanzen bestehen nach Untersuchungen von Andrlik [14]) aus Betain, das nach Versuchen von F. Ehrlich und Lange [15]) von Kulturhefen gar nicht angegriffen wird. Der übrige Teil der Stickstoffverbindungen der Melasse besteht hauptsächlich aus Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Tyrosin, Glutaminsäure, Spaltprodukten von Nucleinsubstanzen wie Adenin, Vernin und anderen, neben sehr geringen Mengen Peptonen, Ammoniumsalzen und Nitraten. Für die Hefe assimilierbar sind davon bei dem in den Preßhefefabriken üblichen Lüftungsverfahren nach Versuchen von J. Weber[16]) nur die Aminosäuren, Ammoniumsalze und Peptone. Diese Stickstoffquellen stehen also der Hefe, deren Gärtätigkeit immer mit Wachstum verbunden ist, zum Aufbau neuer Hefezellen zur Verfügung. In den Melassebrennereien muß sie ihren Stickstoffbedarf fast ausschließlich daraus decken, denn wenn überhaupt in diesen Betrieben der Maische stickstoffhaltige Nährstoffe zugesetzt werden, so ist deren Menge so minimal, daß es sich dabei nur um tausendstel Prozente Stickstoff, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse handelt. Beim Wachstum in Melassemaischen ist also die Hefe gezwungen, vorwiegend die Stickstoffkörper der Melasse und damit auch die Fuselalkohol hauptsächlich bildenden Aminosäuren Leucin und Isoleucin zu zersetzen, um daraus Ammoniak zum Aufbau von neuem Körpereiweiß abzuspalten. Hieraus erklärt sich die größere Fuselölausbeute und der stärkere d-Amylalkoholgehalt in den Fuselölen der Melassespiritusbrennereien.

---

*) Bis auf eine Ausnahme (Ic), wobei offenbar die schlechte Ausbeute an Fuselöl durch ungeignete Konstruktion oder Behandlung des Fuselölabscheiders zu erklären ist.

[14]) Andrlik: Böhm. Zeitschr. f. Zuckerind. 1900/1, 271.

[15]) Ehrlich und Lange: Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerind. 64, 158 (1914).

[16]) Zeitschr. f. ang. Chem. 39, 443 (1926).

Wesentlich abweichend von der Arbeitsweise der Melassebrennereien ist die der mit Melassemaischen arbeitenden Preßhefefabriken. Diese gewinnen Hefe als Hauptprodukt und Alkohol als Nebenerzeugnis. Früher wurde Preßhefe ausschließlich aus Getreideschrot, Malzkeimen und Darrmalz hergestellt. Aus Mangel an Getreide, und um dieses besser direkt für die menschliche Ernährung zu verwenden, ging man in Deutschland im Weltkrieg und in der Nachkriegszeit in immer größerem Maßstabe dazu über, als Rohstoff und Gärmaterial für die Bereitung der Maischen hauptsächlich die in den Zuckerfabriken abfallende Melasse zu verwenden, die wegen ihres hohen Zuckergehaltes (bis 50 %) und wegen ihres Gehalts an anderen wertvollen Nährstoffen hierfür besonders geeignet erschien. Allerdings fehlen der Melasse leicht assimilierbare Stickstoffverbindungen in größeren Mengen, und auch ihr Gehalt an Phosphorsäure ist nicht ausreichend, um im Dauerbetrieb eine gärkräftige Hefe in mehreren Generationen zu gewinnen. Deshalb setzen die Hefefabriken ihren Maischen meistens Malzkeime, die reich sind an stickstoffhaltigen Verbindungen, und Phosphorsäure oder Phosphate hinzu. Auch die Düngung der Melassemaischen mit Ammoniaksalzen ist vielfach, wenn auch nicht mit genügendem Erfolg angewandt worden.

Kurz vor dem Kriege fanden dann Wohl und Scherdel[17]), daß zur Gewinnung einer guten und gärkräftigen Preßhefe die Maischen auch mit organischen und anorganischen Stickstoffverbindungen in ganz bestimmten Verhältnissen gedüngt werden können. Sie beobachteten, daß die Ausbeute an Hefe und ihre Gärkraft praktisch so gut wie gar nicht beeinflußt wird, wenn man einen Ersatz des organischen Stickstoffs der Malzkeime, und zwar bis fast zur Hälfte, durch die billigeren anorganischen Ammoniaksalze vornimmt. Deshalb bevorzugt heute die Mehrzahl der Hefefabriken dieses wesentlich billigere Verfahren, bei dem die Hefe in Maischen mit gemischten organischen und anorganischen Stickstoffverbindungen gemästet wird.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, bewegen sich in den Hefefabriken, deren Produkte ich untersucht habe, nach den mir erteilten Auskünften die in Form von Malzkeimen und Ammoniaksalzen den Maischen zugesetzten Stickstoffmengen zwischen 0,15 und 0,8 % N, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse. Das sind aber Stickstoffzusätze, deren Mengen ungefähr an den Gehalt der assimilierbaren Stickstoffverbindungen der Melasse heranreichen und welche die in den Melassebrennereien zur Düngung der Maischen bisweilen verwendeten Stickstoffmengen um das hundertfache und mehr übertreffen.

---

[17]) Wohl und Scherdel: Zeitschr. f. angew. Chem. 6, 41 (1921). D. R. P. 310 580.

So beträchtliche Mengen leicht assimilierbarer Stickstoffnährstoffe, wie man sie in Form von Malzkeimen und Ammoniaksalzen in den Preßhefefabriken den Maischen zusetzt, werden unter diesen Umständen naturgemäß von den wachsenden Hefezellen in erster Linie für ihren Eiweißaufbau ausgenutzt werden, während in diesen Fällen die Leucine der Melasse nur in bedeutend vermindertem Maße zur Assimilation kommen. Da bei der Spaltung jede Aminosäure dadurch, daß die Hefe ihr nur Ammoniak für den Eiweißaufbau entzieht, typische von der Konstitution der Aminosäure abhängige Nebenprodukte auftreten, so ist es klar, daß weniger Fuselöl und weniger d-Amylalkohol sich bilden muß, wenn vorwiegend andere Aminosäuren als Leucin und Isoleucin, oder Ammoniaksalze während der Gärung von der Hefe assimiliert werden. Damit ist auch die Erklärung für die verminderte Ausbeute an Fuselölen und ihren geringeren Gehalt an d-Amylalkohol in den Preßhefefabriken, die mit Melassemaischen arbeiten, gegeben.

Für die Bildung der Amylalkohole bei der Preßhefenfabrikation kommen in Bezug auf ihre Ursprungsmaterialien drei Möglichkeiten in Betracht. Die erste ist die im vorstehenden Abschnitt diskutierte, daß die Amylalkohole aus den in geringerem Maße an der Stickstoffassimilation der Hefe beteiligten Leucinen der Melasse selbst stammen. Hierdurch wird zwar die verminderte Fuselölbildung und der geringere Gehalt der Fuselöle an Amylalkoholen sehr gut erklärt, aber nicht die Tatsache, weshalb das Mengenverhältnis der beiden strukturisomeren Amylalkohole in der Fraktion 128—132° C ein anderes geworden ist, wie bei den Fuselölen aus reinen Melassemaischen der Brennereien. Wenn die Hefe bei einem Uebermaß anderer Stickstoffquellen die Leucine der Melasse weniger zum Aufbau neuer Zellen in Anspruch nimmt, so ist nicht einzusehen, weshalb sie dabei das Isoleucin mehr schont, als das Leucin, besonders da in Bezug auf Assimilierbarkeit beide gleichwertig sind.

An der Fuselölbildung bei der Melassepreßhefenfabrikation könnten weiterhin Aminosäuren aus den Malzkeimen beteiligt sein. Dadurch könnte der geringere d-Amylalkoholgehalt der Amylalkoholfraktion erklärt werden, denn in keiner natürlichen eiweißhaltigen Pflanzensubstanz kommt das Isoleucin, die Muttersubstanz des d-Amylalkohols, neben dem Leucin in so großen Mengen vor, wie in der Melasse.

Gegen diese Möglichkeit der Fuselölbildung spricht aber die Tatsache, daß, wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, durch qualitativ wie quantitativ beträchtlich variierende Stickstoffzusätze, auch solche, die nur aus Ammoniaksalzen ohne Malzkeime bestehen, das Verhältnis von inaktivem Isoamylalkohol zu d-Amylalkohol praktisch kaum beeinflußt wird, der Gehalt an d-Amylalkohol schwankt zwischen 18,38 und 24,12% und liegt bei der Mehrzahl der untersuchten Fuselöle zwischen 19 und 21%.

Diese Konstanz *) im d-Amylalkoholgehalt der Fraktion 128 bis 132° C weist auf die dritte Möglichkeit der Fuselölbildung hin, nämlich die, daß die Hefe selbst als Eiweiß und dessen Spaltprodukte spendendes Material in Betracht kommt. Die Fuselölbildung könnte sich dabei in der Weise vollziehen, daß die Hefe, vielleicht unter dem Einfluß reichlicher Stickstoffdüngung oder der Lüftung, durch ihr autolytisches Ferment ihr eigenes Eiweiß in Pepton und Aminosäuren hydrolytisch spaltet und aus diesen Spaltprodukten Eiweiß wieder aufbaut.

Da bei dieser Eiweißsynthese wie früher erwähnt, die Aminosäuren einen Abbau zu den entsprechenden Alkoholen erfahren, so müßten hierbei naturgemäß inaktiver und optisch aktiver Amylalkohol in demselben Verhältnis entstehen, in dem Leucin und Isoleucin im Hefeneiweiß vorhanden sind. Bei der großen Schwierigkeit der quantitativen Bestimmung der beiden Leucine und ihrer Trennung voneinander ist es nicht verwunderlich, wenn über die Mengenverhältnisse, in denen die Leucine im Hefeneiweiß vorkommen, bis jetzt keine bestimmten Angaben vorliegen. Immerhin läßt sich aus den Arbeiten von F. Ehrlich [18]) und F. Ehrlich und Wendel [19]) über die Leucinfraktionen des Eiweiß soviel ersehen, daß wohl in der Melasse, bezw. im Eiweiß der Rübe Isoleucin in annähernd gleichen Mengen vorhanden ist wie Leucin, daß aber in allen bisher sonst untersuchten Eiweißarten die Menge des Isoleucins gegenüber dem Leucin beträchtlich zurücktritt. So wurde z. B. im Weizenkleber (Roborat) gefunden, daß die Menge des Isoleucins nur etwa ein Viertel bis ein Fünftel des Leucins betrug, und daß im Hefeeiweiß wahrscheinlich ein ähnlich niedriger Gehalt der Leucine an Isoleucin vorliegt. Daraus muß gefolgert werden, daß in einem aus den Aminosäuren des Hefeneiweiß selbst hervorgegangenen Fuselöl die Menge des d-Amylalkohols in der Amylalkoholfraktion entsprechend geringer sein muß. Dieses trifft auch für die in der Tabelle 2 vermerkten Zahlen für den Gehalt an d-Amylalkohol bei den Fuselölen aus stark mit Stickstoff gedüngten Melassemaischen der Preßhefefabriken durchaus zu. Der konstant etwa ein Fünftel betragende Gehalt an d-Amylalkohol der gesamten Fraktion ist von derselben Größenordnung, wie Isoleucin in dem Leucingemisch von Getreideeiweiß beobachtet wurde.

---

*) Kleine Abweichungen können darauf zurückzuführen sein, daß es sich um Rohzucker- und Raffineriemelassen aus den verschiedensten Gegenden Deutschlands handelte, die vielleicht mit mehr oder weniger stark mit Kahmhefen verunreinigter Betriebshefe vergoren wurden.

[18]) F. Ehrlich: Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerind. 54, 675 (1904); 55, 556/57 (1905).

[19]) Ehrlich und Wendel: Biochem. Zeitschr. 8, 419 (1908).

Später beschriebene Gärversuche mit Maischen, die stark mit Stickstoff gedüngt waren, machen die Annahme über diese besondere Art der Fuselölbildung aus dem Eiweiß der Hefe selbst recht wahrscheinlich.

In diesem Zusammenhang schien mir eine weitere Untersuchung darüber interessant, ob sich außer bei dem d-Amylalkohol auch bei anderen Bestandteilen Unterschiede bei den Fuselölen aus Melassebrennereien und aus Preßhefefabriken ermitteln ließen. Von besonders charakteristischen Verbindungen, die allerdings nur in sehr geringen Mengen im Fuselöl gefunden wurden, ist der zuerst von Neuberg und Nord [20]) 1914 isolierte normale Amylalkohol bemerkenswert, über dessen Vorkommen bisher weitere Angaben nicht vorliegen.

Ich habe daher zur Ergänzung meiner Untersuchungen über die verschiedenen Fuselöle die oberhalb der beiden Amylalkohole siedenden Fraktionen auf n-Amylalkohol untersucht.

Aus den gesammelten Rückständen der Fuselöle aus den Hefefabriken ließ sich oberhalb 132° eine Fraktion vom Siedepunkt 135—145° und sehr geringer Linksdrehung abscheiden, deren Menge etwa 2 g aus 2,4 kg Fuselölen betrug, und die vermutlich im wesentlichen aus n-Amylalkohol bestand.

Die gesammelten Rückstände der Fuselöle aus Melassebrennereien ergaben bei der Untersuchung auf n-Amylalkohol kein positives Ergebnis, da in diesen Betrieben den gärenden Maischen bisweilen Schaumdämpfmittel (minderwertige Paraffinöle) zugesetzt wurden, die in Anbetracht ihres hohen Siedepunktes die Abscheidung der geringen Menge n-Amylalkoholfraktion undurchführbar machten.

Es wurde daher ein aus einer reinen Melassemaische stammendes, von fremden Oelen freies Fuselöl der Melassespiritusbrennerei Fuhrmann & Co. in Schönebeck in größeren Mengen näher untersucht. Aus 5 kg dieses Fuselöls wurden schließlich 6,1 g einer Fraktion vom Siedepunkt 134 –138° gewonnen, die hauptsächlich aus reinem normalem Amylalkohol neben sehr wenig d-Amylalkohol bestand. Zur Identifizierung wurde der n-Amylalkohol zur n-Valeriansäure oxydiert, deren Kalksatz in seiner Zusammensetzung dem Kalksalz der n-Valeriansäure von der Formel $(C_5 H_9 O_2)_2 Ca + H_2 O$ entsprach.

In Bestätigung der Resultate von Neuberg und Nord zeigte sich also, daß im Melassefuselöl tatsächlich neben Isoamylalkohol und d-Amylalkohol noch der normale Amylalkohol vorhanden ist, allerdings in äußerst geringen Mengen, die nur 0,143 Gew. % vom getrockneten Fuselöl ausmachen. Neuberg und Nord fanden 0,3 % n-Amylalkohol, die noch mit 5,19 % d-Amylalkohol verunreinigt

[20]) Neuberg und Nord: Biochem. Zeitschr. 62, 485 (1914).

waren, während der von mir isolierte n-Amylalkohol nur noch 4,78 % d-Amylalkohol enthielt.

Es scheint, daß im Fuselöl der Preßhefefabriken, wie aus meinen Zahlen gefolgert werden könnte, weniger n-Amylalkohol vorhanden ist, als im Fuselöl der Melassebrennereien. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß die starke Stickstoffdüngung der Melassemaischen in den Preßhefefabriken auch hier die Ursache für die Zurückdrängung der Bildung des n-Amylalkohols ist, wie das vorher analog für die Bildung des d-Amylalkohols geschildert worden ist. Jedenfalls muß aus diesen Untersuchungen und denen von Neuberg und Nord gefolgert werden, daß der n-Amylalkohol bei der Eiweißassimilation der Hefe aus einer n-Aminocapronsäure, dem „Norleucin" hervorgegangen ist, das im Eiweiß der Rübe, des Getreides und vielleicht auch der Hefe neben Leucin und Isoleucin vorhanden ist, dessen Menge darin aber nur äußerst gering sein kann. Nachgewiesen ist das Norleucin bisher nur von Abderhalden und Weil[21]) im Eiweiß der Nervensubstanz, das auch nur Spuren davon enthält.

---

[21]) Abderhalden und Weil: Zeitschr. f. phys. Chem. 84, 39 (1913); 88, 272 (1913).

1. Untersuchung verschiedener Fuselölproben aus Melassespiritusbrennereien und Melassepreßhefefabriken durch fraktionierte Destillationen. Polarimetrische Untersuchung auf optisch aktiven Amylalkohol.

Es wurden folgende Fuselölproben untersucht:

1. aus Melassebrennereien.

Fuselöl Nr.	bezogen am	Herstellende Fabrik
Ia	6. 7. 1923	Mittelschlesische Melasse-Brennerei
Ib	31. 11. 1925	
Ic	7. 4. 1925	
II	9. 9. 1924	Sächsische Brennerei
III	11. 11. 1925	Mittelschlesische Brennerei
IV	11. 11. 1925	Brennerei in Anhalt
V	12. 12. 1925	Brennerei in Hannover

2. aus Melassepreßhefefabriken

Fuselöl Nr.	bezogen am	Herstellende Fabrik
VI	26. 11. 1924	Oberschlesische Hefefabrik
VIIa	26. 6. 1923	Sächsische Preßhefefabrik
VIIb	26. 6. 1923	
VIIc	21. 11 1924	
VIII	6. 12. 1924	Hamburger Hefefabrik
IX	25 11. 1924	Hefefabrik in Holstein
X	20. 11. 1924	Hefefabrik in Sachsen
XI	12. 12. 1924	Westfälische Hefefabrik
XII	27. 11. 1924	Sächsische Hefefabrik

Fuselöl VIIa stammt von derselben Probenahme wie VIIb, unterscheidet sich aber von diesem äußerlich dadurch, daß es eine hellere Farbe hat. Bei Fusel VIIb, das längere Zeit an der Luft gestanden hatte, war die Farbe deutlich nachgedunkelt. Fuselöl XI riecht intensiv nach Essigsäureäthylester. Fuselöl XII sieht sehr dunkel und schmutzig aus und mußte zum Polarisieren durch Filtrieren über Blutkohle geklärt werden. Die Fuselöle wurden zunächst in der Form, wie sie von den Fabriken geliefert worden waren, polarisiert und daraus der Gehalt an d-Amylalkohol berechnet. Bei der Berechnung des Gehalts an d-Amylalkohol wurde die Drehung auf den

von Marckwald[22]) gefundenen Wert für 100prozentigen d-Amylalkohol $\alpha_D = -9{,}63^0$ (l = 2) bezogen. Die erhaltenen Werte sind aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich.

Polarimetrische Untersuchung der ursprünglich bezogenen Fuselöle aus Melassebrennereien und Melassepreßhefefabriken.

Fuselöl Nr.	$\alpha_D = {}^0$Sacch. (l = 2)	Kreisgrade (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
Ia	—5,6	—1,94	20,5
Ib	—8,4	—2,91	30,2
Ic	—9,2	—3,19	33,1
II	—6,8	—2,36	24,5
III	—7,2	—2,50	25,96
IV	—8,2	—2,85	29,1
V	—7,2	—2,50	25,96
VI	—3,4	—1,18	12,3
VIIa	—3,4	—1,18	12,3
VIIb	—3,4	—1,18	12,3
VIIc	—3,2	—1,11	11,5
VIII	—3,3	—1,15	12,0
IX	—4,1	—1,42	14 7
X	—5,3	—1,84	19,1
XI	—2,8	—0,97	10,1
XII	—3,6	—1.25	12,97

Schon aus dieser vorläufigen Untersuchung ist ein höherer Gehalt an optisch aktivem Amylalkohol in den Fuselölen der Melassebrennereien gegenüber denen der Preßhefefabriken ersichtlich.

Die Fuselöle wurden nun zunächst getrocknet. Zu diesem Zweck wurden je 300 g eines jeden Fuselöls mit 30 g entwässertem Kaliumcarbonat versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Bei sämtlichen Fuselölen setzte sich eine wässerige kaliumcarbonathaltige Schicht ab. Die Fuselöle wurden mittels Scheidetrichter von dieser getrennt und nochmals mit Kaliumcarbonat versetzt, um ihnen eventuell noch vorhandenes Wasser zu entziehen. Als nach 24 Stunden keine weitere Wasserabscheidung mehr festzustellen war, wurden die Fuselöle vom Kaliumcarbonat abfiltriert. Die getrockneten Fuselöle wurden nochmals polarisiert und aus ihrem Gewichtsverlust ihr ungefährer Wassergehalt berechnet. Die dabei ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

[22]) W. Marckwald: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 1041 (1902).

Wassergehalt der Fuselöle und polarimetrische Untersuchung nach dem Trocknen mit Kaliumcarbonat.

Fuselöl Nr.	% Wassergehalt	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
Ia	20,4	−2,08°	21,6
Ib	15,6	−3,05°	31,7
Ic	14,6	−3,30°	34,3
II	11,5	−2,64°	27,4
III	3,9	−2,57°	26,7
IV	4,4	−3,02°	31,4
V	11,4	−2,64°	27,4
VI	13,1	−1,28°	13,3
VIIa	16,8	−1,25°	13,0
VIIb	22,1	−1,28°	13,3
VIIc	21,2	−1.21°	12,6
VIII	11,8	−1,21°	12,6
IX	19,7	−1,49°	15,5
X	13,1	−1.94°	20,5
XI	19,1	−1 04°	10,8
XII	13,3	−1,39°	14,4

Um die verschieden hoch siedenden Bestandteile der Fuselöle voneinander zu trennen, wurden dieselben unter Verwendung eines Birektifikators nach Golodetz der fraktionierten Destillation unterworfen und die Fraktionen polarisiert. Die nachstehenden Tabellen enthalten die Ergebnisse dieser fraktionierten Destillationen.

Erste fraktionierte Destillation der Fuselöle.
Fraktionen aus Fuselöl Ia (238,65 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	80—95° C.	37,38 g	−0,28°	2,91
2	95—101	10,40 g	−0,35°	3,63
3	101—115	35,65 g	−1,15°	11,94
4	115—132	150,22 g	−2,78°	29,07
Rückstand	über 132	5,00 g		

Fraktionen aus Fuselöl Ib (253,2 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	82—91° C.	29,88 g	—0,45°	4,67
2	91—110	33,30 g	—1,60°	17,09
3	110 –122	61,55 g	–2,95°	30,63
4	122—132	121,20 g	–3,82°	39 66
Rückstand	über 132	8,27 g		

Fraktionen aus Fuselöl Ic (256,2 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	80—93° C.	24,98 g	—0,63°	6,48
2	93—110	36,60 g	—1,67°	17,29
3	110—123	68,45 g	—3,12°	32,43
4	123—132	119,08 g	—4,15°	43,13
Rückstand	über 132	6,37 g		

Fraktionen aus Fuselöl II (265,5 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	79—95° C.	29,00 g	—0,31°	3,24
2	95—105	14,20 g	—0,35°	3,63
3	105—118	46,75 g	—1,67°	17,29
4	118—132	161,80 g	—3,23°	33,51
Rückstand	über 132	10,00 g		

Fraktionen aus Fuselöl III (288,4 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	88—119° C.	13,00 g	—1,77°	18,38
2	119—124	11,50 g	3,05°	31,71
3	124 –128	29,91 g	—3,57°	37,11
4	128—132	148,50 g	4,13°	42,88
Rückstand	über 132	83 11 g		

Fraktion I war milchig trübe, anscheinend von Oeltröpfchen des in der Fabrik den gärenden Maischen zum Schaumdämpfen zugesetzten Oeles. Nach Stehenlassen über Nacht hatten sich 2 klare Schichten gebildet, die mittels Scheidetrichter voneinander getrennt wurden. Das isolierte Schaumdämpföl war optisch inaktiv. Der Rest der Fraktion I wurde filtriert und polarisiert: $\alpha_D = -5{,}1^0$ Sacch. (l=2).

Fraktionen aus Fuselöl IV (286,9 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	86—106° C.	55,41 g	—1,39°	14,41
2	106—120	25 22 g	—2,57°	26,66
3	120—128	52,08 g	—3,37°	34,95
4	128—132	125,29 g	—3,57°	37,11
Rückstand	über 132	16,40 g		

Fraktionen aus Fuselöl V (265,05 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	82—100° C	62,65 g	—0,56°	5,77
2	100—116	58,25 g	—1,46°	15,13
3	116—128	49,55 g	—3,30°	34,23
4	128—132	85,66 g	—4,23°	43,96
Rückstand	über 132	8,90 g		

Fraktionen aus Fuselöl VI (260,7 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	82—92° C.	24,89 g	0	0
2	92—125	136,10 g	—0,87°	9,01
3	125—132	67,45 g	—1,70°	17,64
Rückstand	über 132	7,20 g		

Bei Fuselöl VI wurde anstelle des Birektifikators der Marckwald'sche Apparat zur Destillation verwendet. Bei 126° C sprang dessen Destillierkolben, wodurch ein Teil der Fraktion 3 verbrannte.

Fraktionen aus Fuselöl VIIa (249,7 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	78 95° C.	69,98 g	−0,24°	2,52
2	95–111	20,60 g	−0,83°	8,65
3	111–125	43,05 g	−1,39°	14,41
4	125–132	107,00 g	−1,74°	18,02
Rückstand	über 132	9,07 g		

Fraktionen aus Fuselöl VIIb (233,7 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	79 106° C.	67,68 g	−0,31°	3,24
2	100–111	24,10 g	−0,80°	8,28
3	111–125	45,95 g	−1,46°	15,13
4	125–132	93,20 g	−1,80°	18,73
Rückstand	über 132	2,67 g		

Fraktionen aus Fuselöl VIIc (236,5 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	80–95° C.	46,98 g	−0,21°	2,16
2	95–111	44,60 g	−0,73°	7,56
3	111–125	78,45 g	−1,25°	12,97
4	125–132	64,70 g	1,74°	18,02
Rückstand	über 132	1,77 g		

Fraktionen aus Fuselöl VIII (264,7 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	81–101° C.	27,98 g	−0,35°	3,63
2	101–116	55,60 g	−0,87°	9,01
3	116–125	76,95 g	−1,32°	13,69
4	125–132	84,59 g	−1,67°	17,29
Rückstand	über 132	19,57 g		

Fraktionen aus Fuselöl IX (241,0 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	83—105° C.	41,98 g	—0,87°	9,01
2	105—113	51,60 g	—1,28°	13,30
3	113—125	79,45 g	—1,60°	17,09
4	125—132	54,00 g	—2.01°	20,89
Rückstand	über 132	13,97 g		

Fraktionen aus Fuselöl X (260,7 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	84—102° C.	29,98 g	—1,42°	14,70
2	102—112	40,60 g	—1,88°	19,52
3	114—125	92,95 g	—2,08°	21,60
4	125—132	80,69 g	—2,26°	23,42
Rückstand	über 132	17,07 g		

Fraktionen aus Fuselöl XI (242,6 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	72—90° C.	67,98 g	—0,24°	2,52
2	90—105	47.09 g	—0,63°	6.48
3	105—125	76,35 g	—1,25°	12,97
4	125—132	35,69 g	—1,91°	19,82
Rückstand	über 132	15,47 g		

Fraktionen aus Fuselöl XII (260,1 g).

Nr.	Temperatur	Menge	α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	80—101° C.	33,98 g	—0,45°	4,68
2	101—117	20,09 g	—1,18°	12,30
3	117—125	34,45 g	—1,60°	17,09
4	125—132	116.50 g	—1,88°	19,52
5	132—195	11,10 g	—0,38°	3,96
Rückstand	über 195	43,97 g		

Wie ein Ueberblick über die Ergebnisse dieser ersten Destillationen zeigt, war bei diesen nur eine unvollkommene Abtrennung der einzelnen Bestandteile der Fuselöle erreicht worden. Von Bestandteilen des Fuselöls kommen hier in erster Linie in Betracht.

	Kp.
n-Propylalkohol	97° C.
Isobutylalkohol	108°
d-Amylalkohol	128°
Isoamylalkohol	131°

Außerdem war noch die Möglichkeit des Vorhandenseins von verschiedenen Estern naheliegend.

Aus den einzelnen Fuselölen wurden sehr stark schwankende Ausbeuten an den einzelnen Fraktionen erhalten. Ob die niedrig siedenden Fraktionen unterhalb 97° noch Gemische mit Aethylalkohol und Estern enthielten, wurde nicht weiter untersucht. Es scheint aber diese Möglichkeit gegeben, da aus Fuselöl XI, das schon an sich nach Essigester roch, die niedrig siedende Fraktion ebenfalls einen Gehalt an Essigester aufwies. Merkwürdig erscheint, daß selbst die niedrigsten Fraktionen weit unter der Amylalkoholfraktion optische Aktivität zeigten. So wurden schon in den bis 100° siedenden Anteilen Drehungen bei zu $\alpha_D = -0{,}56°$ (1=2) beobachtet. In den nächst höheren Fraktionen stieg dann die Drehung ganz beträchtlich und erreichte sogar in Fraktionen, deren Siedepunkt noch 5° unterhalb des Siedepunktes des d-Amylalkohols lag, Werte bis zu $\alpha_D = -3{,}5°$ (1=2), was einem Gehalt bis zu 35% d-Amylalkohol in der betreffenden Fraktion entsprach. Es kann sich bei all diesen optisch aktiven Destillaten immer nur um d-Amylalkohol gehandelt haben. Offenbar vermag dieser d-Amylalkohol selbst bei vorsichtigster Fraktionierung zu einem beträchtlichen Teil im Dampfstrom der niedriger siedenden Alkohole, wie des Propyl- und Butylalkohols mit überzugehen. Es ist deshalb ein vollständiges Abfangen des d-Amylalkohols in den Destillaten vom Siedepunkt 128—132° C und seine vollständige Gewinnung aus den in den Fuselölen vorliegenden Gemischen nicht möglich. Auch bei der nachfolgenden nochmals durchgeführten Rektifizierung konnte es sich immer nur um eine Anreicherung des d-Amylalkohols in der Amylalkoholfraktion selbst handeln.

Schon bei der ersten Fraktionierung war wieder bemerkenswert, daß die aus Melassebrennereien herstammenden Fuselöle in der die Amylalkohole enthaltenden Fraktion, aus der optischen Drehung berechnet, durchschnittlich einen höheren d-Amylalkoholgehalt aufwiesen, als die aus Melassepreßhefefabriken. (38 % gegenüber 19 %).

Im folgenden wurde nun versucht, in der hoch siedenden Fraktion von 128—132° C eine möglichst große Anreicherung an d-Amylalkohol zu erzielen. Zu diesem Zwecke wurden die Fuselöle noch-

mals fraktioniert destilliert. In jedem Falle wurde Fraktion I eines jeden Fuselöls aus einem kleinen Rundkolben mittels Birektifikator einer Destillation unterworfen, Destillat und Rückstand polarisiert, zum Rückstand die nächse Fraktion hinzugefügt, wieder destilliert, polarisiert usw. Der jedesmal erhaltene höchstdrehende Rückstand der Fuselöle vom Siedepunkt oberhalb 126°, der im wesentlichen nur noch die beiden Amylalkohole enthalten konnte, wurde schließlich nochmals einer sehr vorsichtigen Destillation aus einem einfachen Destillierkolben unter Verwendung eines Normalthermometers unterworfen und die von 128—132° übergehenden Destillate gesondert aufgefangen und polarisiert.

Zweite Fraktionierung der Fuselöle.

Fuselöl Ia (238,65 g).

Aus 37,38 g Fraktion 1.

25,5 g Destillat 80—93° $\alpha_D = + 0{,}28°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = - 0{,}59°$ (l=1).
Aus diesem Rückstand + 10,4 g Fraktion 2,
10,2 g Destillat 88—101° $\alpha_D = \pm 0$.
Rückstand: $\alpha_D = - 0{,}66°$ (l=1).
Aus diesem Rückstand + 35,65 g Fraktion 3,
35 g Destillat 96—116° $\alpha_D = - 0{,}28°$ (l = 2).
Rückstand: $\alpha_D = - 1{,}42°$ (l=1).
Aus diesem Rückstand + 150,22 g Fraktion 4,
50,1 g Destillat 113—126° $\alpha_D = - 2{,}36°$ (l=2).
97 g Rückstand über 126° $\alpha_D = - 2{,}91°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 751 mm Luftdruck 96,0 g = 40,33 % Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -2{,}91°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 30,06 % berechnet wurde.

Untersuchung der rechtsdrehenden Fraktion von Fuselöl Ia.

Da zu vermuten war, daß die Rechtsdrehung des Destillats ($\alpha_D = + 0{,}28°$; l=2) nur von der Anwesenheit optisch aktiver Ester des Amylalkohols herrührte, wurde diese Fraktion zur Verseifung 75 Minuten mit 50 ccm 5prozentiger Natronlauge auf dem Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Die Flüssigkeit färbte sich dabei gelb. Zur Entfernung des Wassers wurde sie im Scheidetrichter mit wasserfreiem Kaliumcarbonat durchgeschüttelt filtriert und polarisiert. Zurückgewonnen wurden auf diese Weise 13 g Flüssigkeit von der Drehung $\alpha_D = - 0{,}14°$ (l=2). Die durch nochmalige Destillation festgestellte Siedetemperatur betrug jetzt 81—103°. Die Drehung blieb $\alpha_D = - 0{,}14°$ (l=2). Durch die mittels Verseifung bewirkte Umwandlung der Rechtsdrehung in Linksdrehung war also erwiesen, daß es sich um einen rechtsdrehenden Ester des Amylalkohols handelte.

Fuselöl Ib (253,2 g).
Aus 29,88 g Fraktion 1.

24,0 g Destillat 82—89°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -0{,}69°$ (1=1).
Aus diesem Rückstand + 33,3 g Fraktion 2,
20,2 g Destillat 86—110°, ($\alpha_D = -0{,}69°$ (1=2).
Rückstand: $\alpha_D = -3{,}54°$ (1=2).
Aus diesem Rückstand + 61,55 g Fraktion 3,
44,0 g Destillat 105—126°, $\alpha_D = -2{,}05°$ (1=2).
Rückstand: $\alpha_D = -4{,}34°$ (1=2).
Aus diesem Rückstand + 121,2 g Fraktion 4,
32,0 g Destillat 118—126°, $\alpha_D = -3{,}64°$ (1=2).
112 g Rückstand über 126°, $\alpha_D = -4{,}13°$ (1=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 751 mm Luftdruck 111 g = 43,87 % Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -4.09°$ (1=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 42,52 % berechnet wurde.

Fuselöl Ic (256,2 g).
Aus 24,98 g Fraktion 1.

16 g Destillat 80—86°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -0{,}97°$ (1=1).
Aus diesem Rückstand + 36,59 g Fraktion 2,
26,05 g Destillat 85—111°, $\alpha_D = -0{,}49°$ (1=2).
Rückstand: $\alpha_D = -2{,}05°$ (1=1).
Aus diesem Rückstand + 68,45 g Fraktion 3,
45 g Destillat 92—126°, $\alpha_D = -2{,}01°$ (1=2).
Rückstand: $\alpha_D = -4{,}61°$ (1=2).
Aus diesem Rückstand + 119,8 g Fraktion 4,
30,1 g Destillat 120—126°, $\alpha_D = -4{,}06°$ (1=2).
119 g Rückstand über 126° $\alpha_D = -4{,}34°$ (1=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 751 mm Luftdruck 118 g = 46,09 % Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -4{,}34°$ (1=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 45,04 % berechnet wurde.

Fuselöl II (265,5 g).
Aus 29,02 g Fraktion 1.

22,7 g Destillat 77—88°, $\alpha_D = -0{,}07°$ (1=2).
Rückstand: $\alpha_D = -0{,}56°$ (1=1).
Aus diesem Rückstand + 14,2 g Fraktion 2,
11,0 g Destillat 81—101°, $\alpha_D = -0{,}07°$ (1=2).
Rückstand: $-\alpha_D - 0{,}62°$ (1=1).
Aus diesem Rückstand + 46,75 g Fraktion 3,
36,05 g Destillat 93—120°, $\alpha_D = -0{,}56°$ (1=2).

Rückstand: $\alpha_D = -3{,}61^0$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 161,8 g Fraktion 4,
47,3 g Destillat 101—126°, $\alpha_D = -2{,}57^0$ (l=2).
128,2 g Rückstand über 126° $\alpha_D = -3{,}57^0$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 743 mm Luftdruck 56,8 g = 21,44 % Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -3{,}47^0$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 36,03 % berechnet wurde.

Fuselöl III (288,4 g).

Da die Fraktion 1 zum großen Teil aus Schaumdämpföl bestanden hatte, und nach dessen Entfernung nur sehr wenig von Fraktion 1 zurückgeblieben war, wurde dieser Rest zusammen mit der Fraktion 2 destilliert.

Aus 20,3 g Fraktion 1 und 2.
9,86 g Destillat 87—120°, $\alpha_D = -0{,}73^0$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}91^0$ (l=1).
Aus diesem Rückstand + 29,9 g Fraktion 3
15,6 g Destillat 113—127°, $\alpha_D = -2{,}74^0$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -4{,}06^0$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 148,5 g Fraktion 4
13,6 g Destillat 121—128°, $\alpha_D = -3{,}96^0$ (l=2).
157,4 g Rückstand über 128°, $\alpha_D = -3{,}99^0$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 754 mm Luftdruck 127,6 = 44,3% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -4{,}10^0$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 42,16% berechnet wurde.

Fuselöl IV (286,9 g).
Aus 55,4 g Fraktion 1.
45,2 g Destillat 83—123°, $\alpha_D = -0{,}94^0$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -3{,}61^0$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 25,2 g Fraktion 2,
20,55 g Destillat 88—127°, $\alpha_D = -2{,}57^0$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -3{,}68^0$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 52,1 g Fraktion 3,
23,6 g Destillat 98—127°, $\alpha_D = -3{,}05^0$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -3{,}71^0$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 125,3 g Fraktion 4,
18,15 g Destillat 122—128°, $\alpha_D = -3{,}61^0$ (l=2).
145,7 g Rückstand über 128°, $\alpha_D = -3{,}57^0$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 744 mm Luftdruck 110,75 g = 38,59% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -3{,}57^0$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 37,11% berechnet wurde.

Fuselöl V (265,9 g).

Aus 62,65 g Fraktion 1.

46,6 g Destillat 82—99°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -2{,}01°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 58,25 g Fraktion 2,
46 g Destillat 92—103°, $\alpha_D = -0{,}35°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -3{,}37°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 49,55 g Fraktion 3,
36,3 g Destillat 102—125°, $\alpha_D = -1{,}91°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -4{,}48°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 85,66 g Fraktion 4,
8,15 g Destillat 122—128°, $\alpha_D = -4{,}23°$ (l=2).
102,35 g Rückstand über 128°, $\alpha_D = -4{,}34°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 750 mm Luftdruck 89,6 g = 33,69% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -4{,}34°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 45,04% berechnet wurde.

Fuselöl VI (260,7 g).

Aus 24,89 g Fraktion 1.

17,5 g Destillat 82—87°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -0{,}38°$ (l=1).
Aus diesem Rückstand + 136,1 g Fraktion 2,
104 g Destillat 85—125°, $\alpha_D = -0{,}87°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -2{,}12°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 67,45 g Fraktion 3,
14,2 g Destillat 118—126°, $\alpha_D = -1{,}91°$ (l=2).
75,8 g Rückstand über 126°, $\alpha_D = -2{,}01°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 751 mm Luftdruck 71,6 g = 27,54% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -2{,}01°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 20,90% berechnet wurde.

Fuselöl VIIa (249,7 g).

Aus 69,88 g Fraktion 1.

60,8 g Destillat 78—110°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -0{,}42°$, (l=1).
Aus diesem Rückstand + 20,6 g Fraktion 2,
23,09 g Destillat 80—125°, $\alpha_D = -0{,}62°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}04°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 43,05 g Fraktion 3,
25,3 g Destillat 100—126°, $\alpha_D = -1{,}32°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}98°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 107 g Fraktion 4,
12 g Destillat 118—126°, $\alpha_D = -1{,}39°$ (l=2).
113 g Rückstand über 126°, $\alpha_D = -1{,}91°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 750 mm Luftdruck 108,5 g = 43,6% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -1{,}91°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 19,82% berechnet wurde.

Fuselöl VIIb (233,7 g).

Aus 67,68 g Fraktion 1,

55,4 g Destillat 79—100°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}53°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 24,1 g Fraktion 2,
18,2 g Destillat 82—118°, $\alpha_D = -0{,}35°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}94°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 45,95 g Fraktion 3,
25,8 g Destillat 85—125°, $\alpha_D = -1{,}04°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -2{,}05°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 93,2 g Fraktion 4,
18,8 g Destillat 118—126°, $\alpha_D = -1{,}81°$ (l=2).
114,7 g Rückstand über 126°, $\alpha_D = -1{,}94°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 749 mm Luftdruck 98,8 g = 42,2% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128—132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -1{,}94°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 20,5% berechnet wurde.

Fuselöl VII c (236,5 g).

Aus 46,98 g Fraktion 1.

33,8 g Destillat 80—95°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}04°$ (l=27).
Aus diesem Rückstand + 44,6 g Fraktion 2,
38,5 g Destillat 87—117°, $\alpha_D = -0{,}45°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}70°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 78,45 g Fraktion 3,
58,4 g Destillat 102—126°, $\alpha_D = -0{,}80°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}94°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 64,7 g Fraktion 4,
15 g Destillat 118—126°, $\alpha_D = -1{,}56°$ (l=2).
81,4 g Rückstand über 126°, $\alpha_D = -1{,}84°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 749 mm Luftdruck 76,5 g = 32,44% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -1{,}84°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 19,1% berechnet wurde.

Fuselöl VIII (264,7 g).

Aus 27,98 g Fraktion 1.

18,4 g Destillat 81—100°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -0{,}45°$ (l=1).
Aus diesem Rückstand + 55,6 g Fraktion 2,

29 g Destillat 86—115°, α_D = —0,59° (l=2).
Rückstand: α_D = —1,49° (l=2).
Aus diesem Rückstand + 76,95 g Fraktion 3,
51,9 g Destillat 105—126°, α_D = —0,90° (l=2).
Rückstand: α_D = —1,84° (l=2).
Aus diesem Rückstand + 84,6 g Fraktion 4,
15 g Destillat 112—126°, α_D = —1,70° (l=2).
113 g Rückstand über 126°, α_D = —1,77° (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 748 mm Luftdruck 109,2 g = 41,36% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128—132° und dem Drehungsvermögen α_D = —1,77° (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 18,38% berechnet wurde.

Fuselöl IX (241 g).
Aus 41,98 g Fraktion 1.

30,5 g Destillat 83—106°, α_D = —0,69° (l=2).
Rückstand: α_D = —0,76° (l=1).
Aus diesem Rückstand + 51,6 g Fraktion 2.
43,3 g Destillat 91—115°, α_D = —1,11° (l=2).
Rückstand: α_D = —2,12° (l=2).
Aus diesem Rückstand + 79,45 g Fraktion 3.
56,5 g Destillat 105—125°, α_D = —1,42° (l=2).
Rückstand: α_D = —2,29° (l=2).
Aus diesem Rückstand + 54 g Fraktion 4,
13 g Destillat 118—126°, α_D = —2,08° (l=2).
75,6 g Rückstand über 126°, α_D = —2,12° (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 748 mm Luftdruck 70,3 g = 29,17% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen α_D = —2,12° (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 21,98% berechnet wurde.

Fuselöl X (260,7 g).
Aus 29,98 g Fraktion 1.

17,7 g Destillat 84—102°, α_D = —1,04° (l=2).
Rückstand: α_D = —1,94° (l=2).
Aus diesem Rückstand + 40,6 g Fraktion 2,
34,2 g Destillat 94—110°, α_D = —1,84° (l=2).
Rückstand: α_D = —2,15° (l=2).
Aus diesem Rückstand + 92,35 g Fraktion 3,
71,1 g Destillat 105—126°, α_D = —1,94° (l=2).
Rückstand: α_D = —2,43° (l=2).
Aus diesem Rückstand + 80,7 g Fraktion 4,
15 g Destillat 120—126°, α_D = —2,32° (l=2).
99,3 g Rückstand über 126°, α_D = —2,32° (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 747 mm Luftdruck 90 g = 34,61% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis

132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -2{,}32°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 24,14% berechnet wurde.

Fuselöl XI (242,6 g).
Aus 67,98 g Fraktion 1.

46,5 g Destillat 72—85°. $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -0{,}80°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 47,1 g Fraktion 2.
40,9 g Destillat 81—102°, $\alpha_D = -0{,}49°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}04°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 76,35 g Fraktion 3,
80 g Destillat 100—125°, $\alpha_D = -1{,}04°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -2{,}08°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 35,7 g Fraktion 4,
12,4 g Destillat 117—126°, $\alpha_D = -1{,}91°$ (l=2).
39,8 g Rückstand über 126°, $\alpha_D = -1{,}98°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 745 mm Luftdruck 34,7 g = 14,33% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -1{,}98°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 20,54% berechnet wurde.

Fuselöl XII (260,1 g).
Aus 33,98 g Fraktion 1.

21,2 g Destillat 80—84°, $\alpha_D = \pm 0°$.
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}28°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 20,1 g Fraktion 2,
12 g Destillat 82—108°, $\alpha_D = -0{,}42°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -1{,}63°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 34,45 g Fraktion 3,
31,6 g Destillat 106—125°, $\alpha_D = -1{,}39°$ (l=2).
Rückstand: $\alpha_D = -2{,}01°$ (l=2).
Aus diesem Rückstand + 116,5 g Fraktion 4 + 11,1 g Fraktion 5,
6,5 g Destillat 120—126°, $\alpha_D = -1{,}84°$ (l=2).
132 g Rückstand über 126°, $\alpha_D = -1{,}80°$ (l=2).

Dieser Rückstand ergab bei der Destillation bei 746 mm Luftdruck 117,7 g = 45,27% Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128 bis 132° und dem Drehungsvermögen $\alpha_D = -1{,}88°$ (l=2), woraus der d-Amylalkoholgehalt zu 19,52% berechnet wurde.

Die Ergebnisse dieser fraktionierten Destillationen, sowie die Angaben der die Fuselöle liefernden Fabriken über die Zusammensetzung der Maischen und die Ausbeuten an Fuselöl sind in den folgenden Tabellen 1 und 2 zusammengestellt. Tabelle 1 enthält die Fuselöle aus den Melassebrennereien, Tabelle 2 die aus den Melassepreßhefefabriken.

Tabelle 1.

Amylalkoholgehalt der Fuselöle aus Melassebrennereien und Zusammensetzung der Maischen.

Fuselöl Nr.	Drehung des getrockneten Fuselöls α_D (l=2)	Amylalkohole im getrockneten Fuselöl %	Amylalkoholfraktion Kp 128–132°		Angaben der herstellenden Fabriken	
			Drehungsvermögen α_D (l=2)	Gehalt an d-Amylalkohol %	Zusammensetzung der Maischen	Fuselölausbeute in Vol % vom reinen Alkohol
Ia	– 2,08°	40,33	– 2,91°	30,06	Es liegen keine Angaben vor	—
Ib	– 3,05°	43,87	– 4,09°	42,52		
Ic	– 3,30°	46,09	– 4,31°	45,04	Auf 253 Zentner Melasse werden zugesetzt: 2 kg Superphosphat 1 kg Ammoniumsulfat = 0,00158 % N	0,22
II	– 2,64°	21,44	– 3,47°	36,03	Nur die Anstellhefe für 100000 Liter Maische wird zur Vermehrung im Reinzuchtapparat mit 15 kg Hefenextrakt, 1.5 kg KCl, 1.3 kg $(NH_4)_2SO_4$, 1 kg Na_3PO_4 versetzt. Die Vergärung der Maischen von 21° Balling erfolgt ohne jeden Zusatz.	0,48
III	– 2,57°	44,30	– 4.10°	42,16	Nur die Anstellhefe wird unter Zusatz von Schröderschem Hefenährpräparat herangezüchtet. Die Vergärung der Melassemaischen von 22–23° Balling erfolgt ohne jeden Zusatz von Hefenährstoffen.	0,18
IV	– 3,02°	38,59	– 3,57°	37,11	Auf ungefähr 370 Zentner Melasse werden zugesetzt: 6300 g Na_3PO_4 3200 g $(NH_4)_2SO_4$ 0,00366 % N 4000 g Riebe-Präparat (Trockenhefe)	keine Angabe
V	– 2,64°	33,69	4,34°	45,04	Die Maische wird lediglich aus Melasse hergestellt und andere Rohmaterialien als Melasse auch bei der Hefereinzucht nicht verwendet.	keine Angabe

Tabelle 2.

Amylalkoholgehalt der Fuselöle aus Melasse-Preßhefefabriken und Zusammensetzung der Maischen

Fusel-öl Nr.	Drehung des getrock-neten Fuselöls α_D (l=2)	Amyl-alkohole im getrock-neten Fuselöl %	Amylalkoholfraktion Kp 128—132°		Angaben der herstellenden Fabriken	
			Drehungs vermögen α_D (l=2)	Gehalt an d-Amylalkohol %	Zusammensetzung der Maischen	Fuselöl-ausbeute in Voll % von reinem Alkohol
VI	— 1,28°	27,54	2,01°	20,90	Melasse von 40,6° alte Bé. wird mit 0,45% Phosphorsäure, 0,05% N als 20%iges $(NH_4)_2SO_4$ u. 0,1% als 40%iges NH_4OH versetzt — 0,15% N	0,3
VIIa	— 1,25°	43,57	— 1,91°	19,82	Die Maischen bestehen aus: 3000 kg Melasse, 600 kg Malzkeimen = 0,8% N, 20 kg Superphosphat	0,24
VIIb	— 1,28°	42,40	— 1,94°	20,50		
VIIc	— 1,21°	32,41	— 1,84°	19,10	Die Maische besteht aus: 3000 kg Melasse, 200 kg Malzkeimen, 45 kg Ammoniumsulfat } 0,567% N	keine Angabe
VIII	— 1,21°	41,36	— 1,77°	18,38	Die Maische besteht aus: 100 kg Melasse, 1,7 kg Ammoniumsulfat 0,34% N, 3,78 kg Superphosphat	keine Angabe
IX	— 1,49°	29,17	— 2,12°	21,89	Die Maische besteht aus: 100 kg Melasse, 2,5 kg Ammoniumsulfat 0,5% N, 1,5 kg Superphosphat	0,24
X	— 1,94°	34,61	— 2,32°	24,12	Es liegen keine Angaben vor	
XI	— 1,04°	14,33	1,98°	20,54	Maischen mit Superphosphat und Ammoniumsulfat neben ganz minimalen Mengen Malzkeimen	keine Angabe
XII	— 1,39°	45,27	— 1,88°	19,52	Reine Melassemaische wird mit 0,5% anorganischem Stickstoff und 0,6% P_2O_5 versetzt	0,3 0,5

2. Isolierung des normalen Amylalkohols.

Aus den bei den fraktionierten Destillationen der Fuselöle verbliebenen über 132° siedenden öligen Rückständen wurde versucht, n-Amylalkohol nach den Angaben von Neuberg und Nord [20]) zu isolieren. Die Rückstände der Fuselöle aus Melassebrennereien und der aus Melassepreßhefefabriken wurden gesondert untersucht.

Die aus 2100 g der Melassebrennereifuselöle I bis V erhaltenen über 132° siedenden Destillationsrückstände, die 140 g wogen, wurden mit ausgeglühtem Natriumsulfat getrocknet und mittels eines kleinen vierkugeligen Birektifikators destilliert. Es gingen zunächst noch 30 g Gärungsamylalkoholfraktion vom Siedepunkt 129—132° über. die Drehung war $\alpha_D = -2{,}60^0$ (l=2). Weiterhin ließ sich bis 155° nicht ein Tropfen Flüssigkeit isolieren. Die Destillation wurde deshalb unterbrochen, und der Rest aus einem kleinen Destillierkolben destilliert. Dabei wurden folgende Fraktionen aufgefangen:

82 g Destillat 180—240°, $\alpha_D = \pm 0^0$
13,8 g Destillat 240—260°, $\alpha_D = \pm 0^0$
18,45 g Destillat 260 - 275°, $\alpha_D = + 0{,}28^0$. (l = 2)

Die aus 2400 g der Fuselöle aus Melassehefefabriken VI bis XI in Mengen von 85 g erhaltenen über 132° siedenden Rückstände wurden in derselben Weise auf n-Amylalkohol untersucht. Sie wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und mit einem kleinen Birektifikator bei ganz kleiner Flamme sehr langsam destilliert. Dabei ergaben sich 1,9 g einer Fraktion vom Siedepunkt 135—145° und von der optischen Drehung $\alpha_D = -0{,}09^0$ (l=0,25). Sie enthielt also noch 7,2% d-Amylalkohol und vermutlich außerdem n-Amylalkohol. Eine weitere Reinigung und Nachweis dieser Verbindung war aber bei der geringen Menge des erhaltenen Destillats aussichtslos. Es wurde dann noch 1 g einer Fraktion vom Siedepunkt 145—158° aufgefangen. Diese war optisch inaktiv.

Der schwarze, penetrant riechende Rückstand, der 21,5 g wog, wurde im Scheidetrichter ausgeschüttelt, zunächst mit einem Gemisch von 100 ccm konz. Salzsäure und 100 ccm Wasser zur Bindung etwa vorhandener basischer Bestandteile, und zuletzt mit Aether. Dadurch bildeten sich zwei Schichten, die voneinander getrennt wurden. Die obere ätherische Schicht wurde mit Kaliumcarbonat getrocknet, nach 24 Stunden von diesem abfiltriert, mit Aether nachgewaschen und dann der Aether auf dem Wasserbad verdampft. Der Rückstand der 17,3 g wog, wurde destilliert wodurch 13,65 g Destillat vom Siedepunkt 170—360° erhalten wurden. Dieses zeigte die Drehung $\alpha_D = + 0{,}42^0$ (l=2).

Die untere salzsaure Schicht aus dem Scheidetrichter wurde mit Blutkohle filtriert und auf dem Wasserbad eingedampft. Dadurch wurde ein schmutziger Sirup erhalten, in dem sich in Spuren Kristalle abgeschieden hatten. Dieser wurde mit heißem Wasser aufgenommen, mit Blutkohle gekocht, filtriert und das Filtrat auf dem Wasserbad eingedampft. Nach dem Verdampfen der Flüssigkeit blieben 0,14 g gelblich gefärbte Kristalle zurück, die das Chlorhydrat einer nicht näher zu definierenden Base bildeten.

Während es also möglich war, aus den Fuselölen der Hefefabriken eine minimale Menge einer Fraktion, die möglicherweise n-Amylalkohol enthalten konnte abzuscheiden, gelang dieses bei den hier untersuchten Fuselölen aus den Melassebrennereien überhaupt nicht, was daran liegen kann, daß die fraktionierten Destillationen der einzelnen Fuselöle nicht so langsam ausgeführt wurden, wie die von Neuberg und Nord. Des weiteren wurde nur mit einem sechskugeligen Birektifikator gearbeitet, während diese einen achtkugeligen benutzten. Die Trennung von Bestandteilen mit nahe beieinander liegenden Siedepunkten, wie es bei den verschiedenen Amylalkoholen der Fall ist, war vielleicht bei dieser Art der Destillation vollständiger. Außerdem gingen Neuberg und Nord von einem einheitlichen Fuselöl aus, das keine noch höher siedenden Bestandteile enthielt, die den Siedepunkt der n-Amylalkoholfraktion beeinflussen konnten, während die von mir benutzten Ausgangsmaterialien aus mehreren Fabriken mit verschiedener Arbeitsweise stammten.

Auffallend ist, daß in beiden Fällen Fraktionen mit Siedepunkten über 200° C. erhalten wurden, die das polarisierte Licht nach rechts drehten. Wahrscheinlich stammen diese aus in einzelnen Fabriken den gärenden Maischen bisweilen zugesetzten Schaumdämpfmitteln, die mit dem Fuselöl zusammen abgeschieden werden. Als Schaumdämpfmittel werden minderwertiges Erdöl oder Wollfett benutzt. Auf diese könnte auch die beobachtete Rechtsdrehung zurückgeführt werden. Nach den Untersuchungen von P. Soltsien[23]) zeigen nämlich alle Paraffinöle des Handels eine geringe Rechtsdrehung, und J. Marcusson[24]) gelang es, aus Wollfett ein rechts drehendes Oleingemisch vom Charakter der Mineral-Maschinenöle herzustellen.

Die Untersuchung auf n-Amylalkohol wurde daher nochmals mit einer größeren Menge eines einheitlichen Melassefuselöls ausgeführt, das kein Schaumdämpfmittel enthielt und von der Spiritusbrennerei Gustav Fuhrmann u. Co. in Schönebeck geliefert worden war.

5 kg dieses Fuselöls, dessen Drehung $\alpha_D = -2{,}39^0$ (l = 2) war, wurden zu diesem Zweck zunächst mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das getrocknete Oel hatte das Gewicht 4275 g und die Drehung $\alpha_D = -2{,}53^0$ (l = 2). Es enthielt also 26,3% d-Amylalkohol.

[23]) P. Soltsien: Chem. Zentralbl. 1898 I, 869.
[24]) J. Marcusson: Chemische Revue 12, 1 (1905).

Dieses Fuselöl wurde aus einem Kupferkolben mittels eines sechskugeligen Birektifikators bei kleiner Flamme ganz langsam destilliert, so daß die Destillation 10 Tage dauerte. Bei 85° C. gingen die ersten Anteile über. Bis das Thermometer 128° erreichte, waren 2600 ccm = 2130 g überdestilliert. Die Drehung dieser Fraktion war $\alpha_D = -1{,}21°$ (l=2). Dann wurden 2635 ccm = 2123 g Amylalkoholfraktion vom Siedepunkt 128—135° erhalten. Ihre Drehung war $\alpha_D = -4{,}06°$ (l=2). Sie enthielt also 42,2% d-Amylalkohol.

Als letzte Fraktion gingen schließlich 15,5 ccm Flüssigkeit vom Siedepunkt 135—145° über. Die Drehung war $\alpha_D = -0{,}62°$, (l=2).

Diese Flüssigkeit wurde in einem kleinen Scheidetrichter mit 5 ccm verdünnter Schwefelsäure durchgeschüttelt, dann mit etwas Wasser gewaschen und schließlich mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet. Durch nochmalige Destillation mit Birektifikator wurden 6,1 g Flüssigkeit vom Siedepunkt 134—138° erhalten. Diese wurde polarisiert: $\alpha_D = -0{,}23°$ (l=1). Sie enthielt also noch 4,78% d-Amylalkohol.

Nach dem Siedepunkt und der optischen Aktivität zu urteilen, mußte ein Gemisch von n-Amylalkohol mit sehr wenig d-Amylalkohol vorliegen.

Da eine weitere Reinigung mit zu großen Verlusten verbunden gewesen wäre, wurde der vermutete n-Amylalkohol zur Identifizierung nach der Vorschrift von Marckwald [25]) zur n-Valeriansäure oxydiert.

Zur Oxydation wurden 14 g Kaliumdichromat in 175 ccm Wasser gelöst und 18,55 g konz. Schwefelsäure hinzugefügt. Dann wurden tropfenweise 5,3 g des Amylalkoholgemisches zufließen gelassen und die Lösung drei Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nunmehr kochte man die Flüssigkeit bis zur vollständigen Reduktion der Chromsäure am Rückflußkühler und destillierte sie schließlich mit Wasserdampf ab. Das Destillat, das neben Valseriansäure auch deren Amylester enthielt, wurde mit Natronlauge gekocht. Dadurch wurde die Säure gelöst und der Ester verseift. Nach Einengung auf ein kleines Volumen wurde durch Zusatz von Schwefelsäure die Valeriansäure in Freiheit gesetzt, mit Aether aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet und destilliert. Auf diese Weise wurden 2,45 g Säure vom Siedepunkt 182—183° erhalten. In der Literatur wird der Siedepunkt der n-Valeriansäure zu 185—186° angegeben. Eine Drehung des polarisierten Lichtes war im 0,25 dcm-Rohr nicht festzustellen.

Zur endgültigen Identifizierung wurde die Säure in das Calciumsalz übergeführt. Die Calciumsalze der vier isomeren Valeriansäuren unterscheiden sich durch ihren Kristallwassergehalt. Durch

[25]) Marckwald: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 1045 (1904).

Bestimmung des Wasser- und Calciumgehaltes konnte also festgestellt werden, ob n-Valeriansaures Calcium vorlag.

Zu diesem Zweck wurde die erhaltene Säure mit 150 ccm Wasser und überschüssigem reinstem Calciumcarbonat eine Stunde am Rückflußkühler gekocht. Dann wurde die Flüssigkeit heiß filtriert und auf dem Wasserbad in einer Porzellanschale eingeengt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt, in heißem Wasser gelöst und nochmals der Kristallisation bei 25—30° C. überlassen. Die Menge des auf diese Weise erhaltenen Kalksalzes betrug 2,1 g. Die Analyse wurde mit den vor vollständiger Verdunstung abfiltrierten Kristallen ausgeführt, die im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet waren. 0,2176 g Substanz gaben bei 110° getrocknet 0,0153 g H O ab und hinterließen beim Glühen 0,0460 g CaO.

Für $(C_5 H_9 O_2)_2 Ca + H_2 O$ ber: $H_2 O$ 6,92%; Ca 15,37%.
gef: $H_2 O$ 7,03%; Ca 15,11%.

Da nur das Kalksalz der normalen Valeriansäure mit einem Molekül Kristallwasser sich abscheidet, so ist auf Grund der befriedigend stimmenden Analyse die erhaltene Substanz mit Sicherheit als Kalksalz der normalen Valeriansäure zu bezeichnen.

II. Fuselölbildung bei der Melassegärung unter Zusatz anorganischer Stickstoffverbindungen.

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Untersuchungen gestatten zum erstenmal den Ueberblick über die Zusammensetzung von Fuselölen, die aus den verschiedensten Betrieben der Melassegärung herstammen, und über ihre Abhängigkeit von der Zusammensetzung der zur Gärung angestellten Maischen. Das in solchem Umfang und von so verschiedenartiger Herkunft in der Praxis bisher nicht bekannt gewordene Zahlenmaterial zeigte eine ganze Reihe von interessanten Beziehungen der Abhängigkeit der Zusammensetzung der Fuselöle von der Art der Stickstoffernährung der Melassemaischen und der Arbeitsweise der betreffenden Gärbetriebe.

Es schien nun in Hinsicht auf viele praktische Fragen der Fuselölbildung in den Brennereien und nicht minder in Hinsicht auf die Theorie der Vorgänge bei der Eiweißassimilation der Hefe von großer Bedeutung, in ausgedehntem Maßstabe Gärversuche mit Melasselösungen unter Zusatz verschiedener Stickstoffsubstanzen anzustellen, und die Menge und Art des dabei entstehenden Fuselöls zu ermitteln, um die im vorstehenden Abschnitt beobachteten eigentümlichen Erscheinungen in der Gärpraxis des näheren erklären zu können.

Die Untersuchungen von F. Ehrlich[2]) haben gezeigt, daß durch Zusatz genügender Mengen von Stickstoffverbindungen, die von der Hefe leicht assimiliert werden, die Bildung der höheren Alkohole bei der Gärung eingeschränkt oder fast vollständig verhindert werden kann. Im Anschluß daran mußte nun vor allem die Frage interessieren, unter welchen Gesetzmäßigkeiten die Fuselöl- sowie die Alkoholbildung bei der Melassegärung unter Zusatz anorganischer Stickstoffverbindungen, besonders solcher, die heute vorwiegend in den Melassegärbetrieben Verwendung finden, unterworfen ist.

Da die Entstehung der höheren Alkohole bei der Gärung durch die Stickstoffassimilation der lebenden Hefezellen aus den entsprechenden Aminosäuren bedingt ist, so muß ein Zusatz von anderen leichter assimilierbaren Stickstoffverbindungen zur Maische die Fuselölbildung naturgemäß erheblich beeinflussen. Wie die Untersuchungen von F. Ehrlich ergeben haben, verwendet die wachsende Hefe den Stickstoff in Form von Ammoniak zum Aufbau von neuem Körpereiweiß. Es mußte also eine besonders starke Beeinflussung der Fuselölbildung durch Ammoniakverbindungen zu erwarten sein, bei denen die Hefe keine Spaltung auszuführen braucht.

Es wurden daher an Melassemaischen mit käuflicher Preßhefe, die nach dem Lüftungsverfahren hergestellt war, eine Reihe von Gärversuchen angestellt, bei denen parallel ein in bestimmtem Mengenverhältnis wechselnder Stickstoffzusatz in Form von Ammoniumsulfat und Ammoniumcarbonat erfolgte. Die in großer Anzahl durchgeführten Versuche ergaben, daß die Menge des entstandenen Alkohols wie auch sein Fuselölgehalt sich abhängig von der Menge des zugesetzten anorganischen Stickstoffs erwiesen. Bei einer Melasse, die nach der Vergärung ohne jeden Stickstoffzusatz einen Spiritus mit 1,12 Vol. % Fuselöl ergab, ließ sich die Fuselölbildung durch reichliche Stickstoffgaben bis auf 0,2 Vol. % vermindern. Diese Einschränkung der Fuselölbildung war erreicht worden durch einen Zusatz von 2,5% N in Form von Ammoniumsulfat, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse. Bei geringeren Stickstoffzusätzen schwankte der Fuselölgehalt zwischen den genannten Werten, erwies sich jedoch immer annähernd proportional der zugesetzten Stickstoffgabe. (Tabelle 3.)

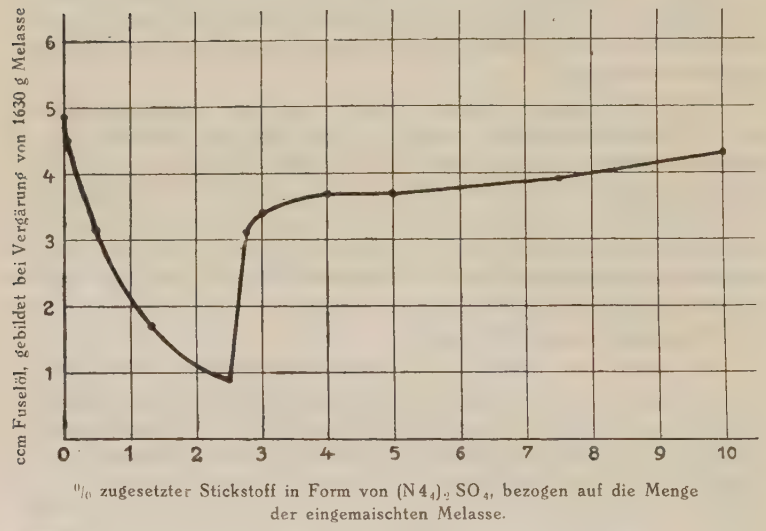
Auch Ammoniumcarbonat verhielt sich ganz analog (Tabelle 4) wie das Ammoniumsulfat, indem durch steigende Zusätze dieses Stickstoffkörpers bis zu 2,5% die Fuselölausbeute ständig herabgedrückt wurde. Wenn in diesem Falle nicht die Minimalzahl für Fuselöl und die Maximalzahlen für Alkohol erreicht wurden, so ist dieses darauf zurückzuführen, daß die Versuche nicht wie die mit Ammoniumsulfat einheitlich mit derselben Melasse, sondern infolge von Mangel an Material mit Melassen zweier verschiedener Fabriken und Jahrgänge angestellt wurden.

Es schien nun durchaus im Bereich der Möglichkeit zu liegen, daß durch eine weitere Zugabe von Ammoniumsulfat bei einer entsprechenden Ueberschwemmung der Maischen mit anorganischem Stickstoff, die Hefe die noch vorhandenen Leucine überhaupt nicht angriff und dementsprechend der Fuselölgehalt des Alkohols auf 0 herabsinken mußte. Tatsächlich haben nun aber die weiteren Versuche ein dieser Annahme gerade entgegengesetztes Resultat geliefert. Eine weitere Herabsetzung des Fuselölgehalts unter 0,2% war nämlich nicht zu erreichen, sondern es zeigte sich, daß durch die Stickstoffgabe von 2,5% N das Minimum der Fuselölbildung und gleichzeitig das Optimum der Alkoholbildung erzielt worden war. Größere Stickstoffgaben bewirkten ein Fallen der Spiritusausbeute und ein Steigen des Fuselölgehalts. Auch hierbei war wieder ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen der zugesetzten Stickstoffmenge und dem Fuselölgehalt sowie der Spiritusausbeute festzustellen. Die Gärversuche, die mit Stickstoffgaben bis zu 10% N auf eingemaischte Melasse bezogen ausgeführt wurden, zeigten, daß eine Erhöhung der Stickstoffdosis von 2,5 bis auf 10% N eine Zunahme des Fuselölgehalts von 0,2 bis 1,06% und eine Verminderung der Spiritus-

ausbeute von 48,8 bis auf 43,8 Gew.% des in Form von Melasse eingemaischten Zuckers zur Folge hatte. (Tabelle 3.)

Eine anschauliche Uebersicht über die Abhängigkeit der Fuselölbildung von der Menge des der Maische zugesetzten Stickstoffs gibt die folgende graphische Darstellung. Auf der Abscisse wurden steigende Mengen Stickstoff in Prozenten, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse, aufgetragen, auf der Ordinate die Menge des gebildeten Fuselöls in ccm, errechnet aus den Alkoholausbeuten und den Fuselölbestimmungen nach Röse-Herzfeld.

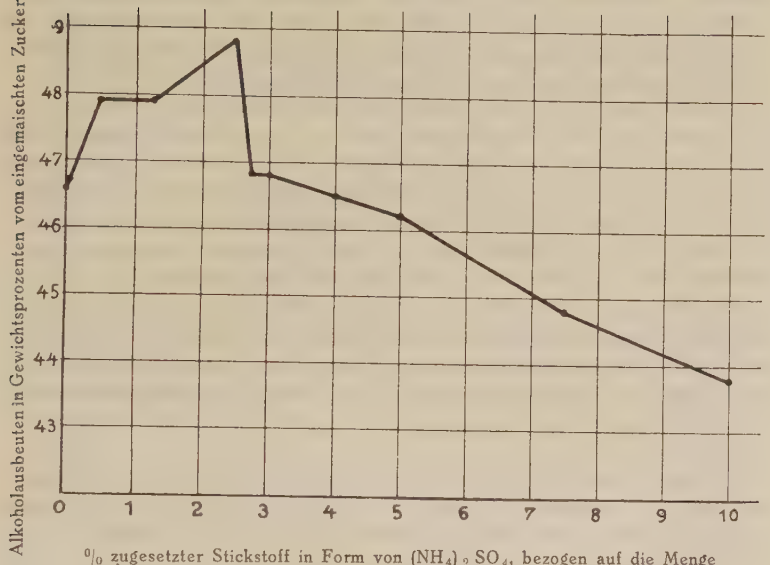
Abhängigkeit der Fuselölbildung bei der Melassegärung von der Stickstoffdüngung der Maischen.



Die erhaltene Kurve demonstriert deutlich die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen den den Maischen zugesetzten Stickstoffgaben und der Menge des durch die Gärung gebildeten Fuselöls.

In gleicher Weise wurden die Beziehungen zwischen Spiritusausbeuten und Stickstoffgaben zur Maische graphisch dargestellt. Wie bei dem vorstehenden graphischen Bild wurde auf der Abscisse der der Maische zugesetzte Stickstoff in Prozenten aufgetragen, auf der Ordinate die Ausbeuten an Alkohol in Gewichtsprozenten des in Form von Melasse eingemaischten Zuckers. Da der Zuckergehalt der zu vergärenden Maischen bestimmt worden war, ließen sich die Spiritusausbeuten in Gewichtsprozenten vom Zucker errechnen, der in der Melasse enthalten war.

Abhängigkeit der Spiritusausbeuten von der Stickstoffdüngung der Melassemaischen.



Die erhaltene Kurve zeigt deutlich, wie durch minimale Stickstoffgaben die Spiritusausbeute erheblich zunimmt, bei 2,5% N ihr Maximum erreicht und bei größeren Stickstoffgaben zunächst sehr stark, dann allmählich wieder abnimmt.

Auffallend ist bei den beiden graphischen Darstellungen, daß das Minimum der Fuselölbildung mit dem Maximum der Alkoholausbeute zusammenfällt. Zweifellos wirkt das in geringen Mengen den Maischen zugesetzte Ammoniumsulfat auf den Verlauf der Gärung und die Alkoholproduktion sehr günstig. Dagegen zeigt es sich, daß Zusätze dieser Stickstoffverbindung über 2,5% N auf Melassegewicht berechnet nachteilig auf die Hefe einwirken, indem mit steigender Stickstoffmenge oberhalb von 2,5% N ein starker Abfall der Alkoholausbeuten eintritt. Es ist nun sehr eigentümlich, daß parallel mit diesem Sinken der Alkoholerträge bei einer Stickstoffgabe über 2,5% von 3 bis 4% ein sehr beträchtliches, dann, von 4 bis 10% N, ein allmähliches Ansteigen der Fuselölmenge zu beobachten ist.

Diese auffallende Erscheinung ist sehr wahrscheinlich so zu erklären, daß die Hefezellen von einer bestimmten Stickstoffmenge an

durch das überflüssige Ammoniumsulfat eine Schädigung erleiden, die auf den Gärungsverlauf ungünstig einwirkt und schließlich eine Verminderung der Alkoholproduktion herbeiführt. Diese Schädigung besteht vermutlich darin, daß bei zu großen Stickstoffgaben über 2,5% N das autolytische Ferment der Hefe, die Endotryptase, zu ungunsten der Zymase starke Förderung erfährt, wodurch der Eiweißabbau der Hefe in immer stärker steigendem Maße einsetzt.

Auf diese Weise wäre auch erklärbar, warum die Fuselölmenge, die zuerst ziemlich proportional bis zu einer Stickstoffgabe von 2,5% N bis auf ein Minimum herabsinkt, durch weitere Zusätze vom Ammoniumsulfat eine anfangs schneller, später langsamer erfolgende Zunahme erfährt, die bei 10% Stickstoffzugabe fast die gleiche Höhe erreicht, wie die Melasse selbst bei der Vergärung ohne jede Stickstoffdüngung. In dem Maße, wie die Autolyse einsetzt, werden die noch lebenden Hefezellen für die Eiweißassimilation die in ihrem Inneren in immer mehr steigendem Maße hydrolytisch abgebauten Aminosäuren, darunter gerade die Leucine, in erster Linie benutzen und die erst in die Hefezellen von außen hineindiffundierenden Stickstoffmengen der Melasse und der Ammoniakzusätze weniger bevorzugen.

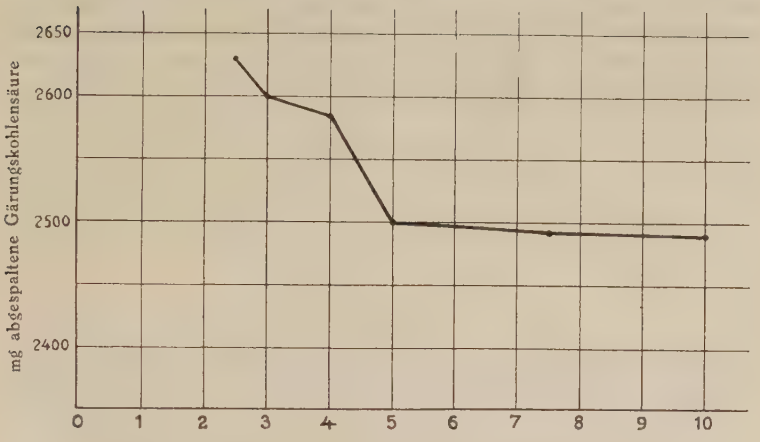
Damit stimmt auch überein, daß die Drehung der Fuselöle, bezw. die daraus berechnete Menge an d-Amylalkohol, wie aus der Tabelle 3 ersichtlich, mit zunehmender Menge des Ammoniumsulfats ständig sinkt.

Man hätte noch vermuten können, daß durch die steigenden Zusätze von Ammoniumsulfat die Maischen eine für die Hefezellen und für die Gärung ungünstige Wasserstoffionenkonzentration erhalten. Vor und nach der Gärung ausgeführte Bestimmungen zeigten aber deutlich, daß eine Beeinflussung des Wasserstoffexponenten durch die Ammoniumsulfatzusätze nicht stattfindet, vielmehr hielt sich bei allen diesen Gärversuchen p_H konstant zwischen 5,4 und 5,0. Es stimmt dieses auch mit den Resultaten der Aziditätsbestimmungen durch Titration durchaus überein. Man muß daher annehmen, daß bei der Melassegärung das Ammoniumsulfat gerade in der Konzentration von 2,5 bis 3% N und darüber hinaus einen besonderen spezifischen Einfluß auf die autolytischen Fermente der Hefe hat. Damit stimmt in befriedigender Weise überein, daß die Kurve der Fuselölausbeute innerhalb dieser Mengen von Stickstoffzusätzen eine ganz besonders auffallende Steigerung erfährt, und daß damit parallel betrachtet, die Kurve für die Alkoholausbeute von 2,5 bis 3% N einen sehr starken Abfall aufweist.

Eine weitere Bestätigung dieser Annahme konnte dann noch in Gärversuchen mit Melasse erbracht werden, in denen unter steigenden Ammoniumsulfatzusätzen die Menge der bei den einzelnen Gäransätzen abgespaltenen Kohlensäure und während (13

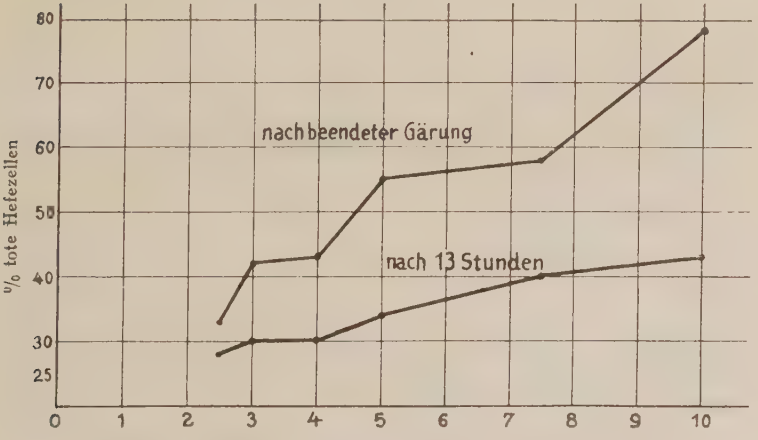
Stunden) sowie nach Beendigung der Gärung (4 Tage) der Prozentsatz der toten, das heißt der sich sofort mit Metyhlenblau färbenden Hefezellen ermittelt wurde. Die Ergebnisse dieser Gärversuche sind nachstehend graphisch dargestellt.

Einfluß von reichlicher Stickstoffdüngung auf die Abspaltung von Gärungskohlensäure bei der Melassegärung.



% zugesetzter Stickstoff in Form von $(NH_4)_2 SO_4$, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse.

Verhältnis von lebenden zu toten Hefezellen unter dem Einfluß reichlicher Stickstoffdüngung bei der Melassegärung.



% zugesetzter Stickstoff in Form von $(NH_4)_2 SO_4$, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse.

Es zeigte sich auch hier wieder gerade zwischen 2,5 bis 5% Stickstoffzusatz starke Abnahme der Gärungskohlensäure und etwa umgekehrt proportional dazu ein Ansteigen des Prozentgehalts an toten Hefezellen.

Weitere Schlüsse aus diesen Versuchen zu ziehen, möchte ich vorläufig vermeiden, doch scheinen hier sehr eigenartige Beziehungen zwischen der Stickstoffassimilation und der Fermentbeeinflussung der Hefe vorzuliegen, die sich infolge ihrer verwickelten Natur vorläufig nicht vollständig übersehen lassen, die aber hinsichtlich ihrer Bedeutung für viele andere biochemische Fragen der Gärung wohl einer weiteren Untersuchung wert sind.

1. Gärversuche mit Melasse unter Zusatz von Ammoniumsulfat.

Untersuchung der zu den Gärversuchen verwendeten Melasse:

Die Melasse war am 8. März 1922 von der Zuckerfabrik vom Rath, Schoeller u. Skene A.-G. in Klettendorf geliefert worden. Die Polarisierung ergab 45,0% Zuckergehalt, die Untersuchung auf Trockensubstanzgehalt 79,2° Brix bei 20° C. Daraus ergibt sich der Reinheitsquotient zu 56,8. Die Melasse war schwach alkalisch. Bis zur sauren Reaktion gegen Lackmus wurden von 20 g Melasse 5 ccm n/10 Schwefelsäure verbraucht.

Vorversuche.

Um zunächst einen Ueberblick über die Art und den Verlauf der Gärung und über die zweckmäßigste Anstellung der später beschriebenen Hauptversuche zu gewinnen, wurden eine Reihe von Vorversuchen ausgeführt, die im folgenden näher beschrieben sind.

Versuch 1: 1630 g Melasse wurden in einer mit Gärverschluß versehenen 10-Liter-Flasche mit destilliertem Wasser zu 7 Litern aufgefüllt, mit 2,04 g konz. Schwefelsäure angesäuert und mit 150 g Preßhefe bei 25° C. zur Gärung angestellt.

Nach 2 Stunden war die Gärung und Schaumbildung so stürmisch, daß die Maische auf drei Flaschen verteilt werden mußte. Nach sechs Tagen ergab die Prüfung auf Vollständigkeit der Vergärung mit Fehlingscher Lösung noch Spuren Kupferoxydul. Da aber die Kohlensäureentwicklung schon lange vollständig aufgehört hatte, wurde die Maische unter Verwendung eines Birektifikators abdestilliert. Nach viermaliger Destillation, das letztemal unter Zusatz von etwas Natronlauge, wurden 610 ccm 68,5 Vol%iger Rohspiritus = 418 ccm reiner Alkohol erhalten. Da die eingemaischte Melasse 733 g Zucker enthielt, beträgt diese Ausbeute 45,0 Gew.% vom eingemaischten Zucker.

Die quantitative Fuselölbestimmung nach der ursprünglichen Röseschen von Stutzer, Reitmaier und Sell modifizierten Methode[26]) ergab 1,09 Vol.% Fuselöl, bezogen auf 100%igen Alkohol. Der Chloro-

[26]) Arbeiten aus dem Kais. Gesundh.-Amt 1888, 4, 109. Zeitschr. f. angew. Chem. 1890, 522.

formauszug war optisch inaktiv. Um ihn mit Fuselöl anzureichern, wurde ein Teil desselben im Vakuumexsikkator verdampft, jedoch war auch dann keine Drehung des polarisierten Lichtes festzustellen.

Um zu versuchen, in welcher Weise sich das Fuselöl nach dem Verfahren A.H. Allen[27]) mit Tetrachlorkohlenstoff extrahieren und polarisieren läßt, wurden 400 ccm 68,5Vol%iger Rohspiritus mit 80 ccm n/10 Natronlauge versetzt und eine Stunde am Rückflußkühler gekocht. Dann wurden 360 ccm der Flüssigkeit abdestilliert, nach dem Erkalten 120 ccm Wasser in den Destillierkolben gegossen und weitere 80 ccm überdestilliert. Dann wurde der Kolben abgekühlt, 40 g Natriumsulfat und 80 ccm Wasser hinzugefügt und nochmals 80 ccm überdestilliert. Das gut durchgemischte Destillat wurde mit soviel konzentrierter Kochsalzlösung, die mit Schwefelsäure angesäuert war, versetzt, bis das spezifische Gewicht der Mischung 1,1 betrug. Dann wurde die Mischung mit Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt und zwar nacheinander mit 120 ccm, 80 ccm und 40 ccm. Der fuselölhaltige Tetrachlorkohlenstoffextrakt wurde polarisiert. Da keine Drehung festzustellen war, wurde um die Lösung an Fuselöl anzureichern, die Hauptmenge des Tetrachlorkohlenstoffs mit dem E. Marckwaldschen Destillierapparat abdestilliert. Der verbleibende Destillationsrückstand von 8,6 ccm ergab mit Kieselgur filtriert und polarisiert: $\alpha_D = -0{,}76^0$ (1=2).

Versuch 2: 1630 g Melasse, 6 g 17%iges Superphosphat, 3 g Ammoniumsulfat = 0,0386% N wurden mit destilliertem Wasser zu 7 Litern aufgefüllt, mit 2,04 g konz. Schwefelsäure angesäuert und mit 150 g Preßhefe bei 19° C. in drei 10-Liter-Flaschen zur Gärung angestellt.

Nach zwei Tagen war die unter starkem Schäumen verlaufende Hauptgärung beendet, so daß die Maische in eine 10-LiterFlasche gebracht werden konnte. Nach vier Tagen wurde Fehlingsche Lösung noch sehr schwach reduziert, desgleichen nach sechs Tagen. Trotzdem wurde die Maische abdestilliert, da keine Gärung mehr festzustellen war.

Nach viermaliger Destillation mit Birektifikator, zuletzt unter Zusatz von Natronlauge, wie bei Gärversuch 1, zur Verseifung möglicherweise entstandener Amyl- oder anderer Ester und zur Zersetzung von Aldehyden, wurden 600 ccm 73 Vol.%iger Rohspiritus = 438 ccm reiner Alkohol erhalten. Diese Ausbeute beträgt 47,1% des eingemaischten Zuckers. Die Fuselölbestimmung ergab 0,93 Vol.% Fuselöl, berechnet auf absoluten Alkohol.

---

[27]) Allen: Journ. Soc. Chem. Ind. 1891, X. 305 u. 519.

Zur Extraktion des Fuselöls wurden 500 ccm Rohspiritus wie bei Gärversuch 1 mit den entsprechenden Mengen Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt. Der dadurch erhaltene fuselölhaltige Extrakt wurde im Marckwaldschen Apparat bis auf 7,7 ccm abdestilliert. Dieser Rückstand ergab mit Kieselgur filtriert und polarisiert: $\alpha_D = -1{,}08^0$ (l=2.)

Versuch 3: 7 Liter Melassemaische von der Zusammensetzung wie in Versuch 2, jedoch mit 40,66 g Ammonsulfatzusatz = 0,5% N, wurden mit 150 g Preßhefe bei 24° C. zur Gärung angestellt. Nach sechs Tagen war die Gärung beendet, und die Maische wurde abdestilliert. Die Säurebestimmung wurde in der in der Praxis üblichen Weise[28]) durchgeführt, indem 20 ccm der vergorenen filtrierten Maische mit n/10 Natronlauge titriert wurden, bis eine Probe auf violett gefärbtem Lackmuspapier keine Rötung mehr hervorrief. Dazu wurden 13 ccm n/10 Natronlauge verbraucht. Der Säuregrad war also 1,3°, was einem Gehalt von 5,85 g Milchsäure im Liter entspricht.

Die Destillation und Konzentrierung des in der vergorenen Lösung enthaltenen Alkohols wurde wie in den Versuchen 1 und 2 ausgeführt. Es wurden 600 ccm 73 Vol.%iger Spiritus = 438 ccm reiner Alkohol erhalten. Das sind 47,1% vom eingemaischten Zucker. Die Fuselölbestimmung ergab 0,67 Vol.% Fuselöl.

Die Fuselölextraktion mit Tetrachlorkohlenstoff wurde mit 500 ccm Rohspiritus ausgeführt und der Extrakt im Marckwaldschen Apparat bis auf 5 ccm abdestilliert. Dieser Rückstand wurde mit Kieselgur filtriert und polarisiert: $\alpha_D = -0{,}9^0$ (l=1).

Um die bei den Fuselölextraktionen mit Tetrachlorkohlenstoff erhaltenen Drehungswerte miteinander vergleichen zu können, wurden sie umgerechnet auf diejenigen, die sich hätten ergeben müssen, wenn jede Extraktion mit einer Rohspiritusmenge von 500 ccm reinem Alkoholgehalt ausgeführt und der Tetrachlorkohlenstoff in jedem Fall bis auf 8,6 ccm mit dem Marckwaldschen Apparat abdestilliert worden wäre. Die sich dabei ergebenen Werte enthält die nachstehende Tabelle.

[28]) Märcker-Delbrück: Handbuch der Spiritusfabrikation. 9. Auflage. Seite 228. Danach entspricht 1 Säuregrad 0,09 g Milchsäure.

Drehung und d-Amylalkoholgehalt der mittels Tetrachlorkohlenstoff aus dem Rohspiritus extrahierten Fuselöle der Gärversuche Nr. 1 bis 3.

Gärversuch Nr.	N-Zusatz zur Maische	Alkoholausbeute in Gew. % vom Zucker	Fuselölgehalt	Fuselölhaltiger CCl_4-Extrakt aus 500 ccm reinem Alkohol eingeengt auf 8,6 ccm	
				α_D (l = 2)	% Gehalt d-Amylalkohol
1	0	45,0	1,09%	—1,39°	14,48
2	0,0386%	47,1	0,93%	—1,33°	13,81
3	0,5%	47,1	0,67%	—1,09°	11,37

Hauptversuche.

Für die nachfolgenden Hauptversuche schien es vor allen Dingen wichtig, nicht allein die Menge des Fuselöls im entstandenen Spiritus zu ermitteln, sondern auch seine Zusammensetzung, namentlich in Hinsicht auf den Gehalt an optisch aktivem d-Amylalkohol. Für diese Untersuchungen wäre es wünschenswert gewesen, das bei der Gärung abfallende Fuselöl ähnlich wie in den Brennereien direkt abscheiden und näher untersuchen zu können. Trotzdem bei meinen Versuchen, relativ große Mengen von Maischen zur Vergärung kamen, war aber eine solche Methode, die nur fabriktechnisch in großem Maßstab in den Brennereien selbst hätte durchgeführt werden können, im Laboratorium nicht gangbar. Ich mußte mich daher damit begnügen, bei den einzelnen Untersuchungen mit Hilfe des sehr gut wirkenden zwölfkugeligen Marckwaldschen Kolonnenapparates durch vorsichtiges Abdestillieren der Hauptmenge des Alkohols einen mit Fuselöl sehr stark angereicherten Spiritus zu gewinnen, dessen unter möglichst gleichen Bedingungen beobachtete optische Drehungen nach entsprechender Umrechnung als Maßstab für den Gehalt des Fuselöls selbst an d-Amylalkohol angenommen wurden. Wenn hierbei auch geringe Verluste an Fuselöl und andere Fehlerquellen sich nicht ganz vermeiden ließen, so sind die bei diesem Verfahren erhaltenen Resultate bei den verschiedenen Gärversuchen doch durchaus vergleichbar und zeigen innerhalb der Fehlergrenzen gute Uebereinstimmung mit den im übrigen beobachteten Gesetzmäßigkeiten.

Die zur Vergärung kommenden Maischen waren in jedem Fall wie folgt hergestellt: Es wurden 1630 g Melasse von der au Seite 45 beschriebenen Zusammensetzung, 6 g 17%iges Superphosphat, 2,04 g konz. Schwefelsäure in Leitungswasser gelöst und damit zu 7 Litern

Flüssigkeit aufgefüllt. Diese reichlich 10% Zucker enthaltende Lösung wurde jedesmal mit in den einzelnen Versuchen wechselnden Mengen Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat gedüngt und mit 150 g Preßhefe vergoren. Als Hefe wurde eine für jeden Versuch frisch bezogene Preßhefe des Handels verwendet, von der Art, wie sie für Backzwecke benutzt wird. Die Hefe stammte aus den Hefefabriken in Friedenthal-Gießmannsdorf und Konstadt in Oberschlesien.

Das Abtreiben und Anreichern des Alkohols erfolgte mittels des Birektifikators nur dreimal, um jeden Verlust an Fuselöl zu vermeiden. Der dadurch erhaltene noch verhältnismäßig alkoholarme Rohspiritus wurde zur weiteren Konzentrierung mit entwässertem Kaliumcarbonat getrocknet, wobei allerdings Alkoholverluste unvermeidlich waren. Der auf dies Weise konzentrierte Rohspiritus wurde zur Entfernung der darin enthaltenen Kohlensäure in einem zu neun Zehntel gefüllten Rundkolben eine halbe Stunde am Rückflußkühler gekocht und dann das Fuselöl darin bestimmt.

Zur Isolierung des Fuselöls wurde eine genau abgemessene Menge Rohspiritus, deren Alkoholgehalt zuvor ermittelt worden war, mit dem Marckwaldschen Apparat bei ganz kleiner Flamme äußerst langsam destilliert, bis nur noch ein Rückstand von wenigen ccm im Destillierkolben des Apparates verblieb, der aus Alkohol, Wasser und Fuselöl bestand. Dieser Rückstand wurde genau gemessen, mit Kieselgur filtriert und polarisiert.

Versuch 4: Melassemaische von der oben angegebenen Zusammensetzung ohne jeden Stickstoffzusatz wurde bei 19° C. in sieben Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 1,11° Säure entspr. 4,99 g Milchsäure im Liter.

Die Spiritusausbeute betrug 433 ccm = 341,64 g reiner Alkohol. Das sind 46,6% vom eingemaischten Zucker. Der Fuselölgehalt wurde zu 1,12 Vol.%, auf absoluten Alkohol bezogen, ermittelt.

Untersuchung des Fuselöls: aus 372 ccm 92,7 Vol.%igem Rohspiritus = 344,84 ccm reinem Alkohl 13,8 ccm Destillationsrückstand von spezifischem Fuselölgeruch. $\alpha_D = -0{,}42°$, (l=1).

Versuch 5: Melassemaische mit einem Zusatz von 3 g Ammoniumsulfat = 0,0386% N, auf ursprüngliche Melasse gerechnet, wurde bei 20° C. in fünf Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung ergab 1,06° Säure entspr. 4,77 g Milchsäure im Liter.

Alkoholausbeute: 434 ccm = 342,43 g reiner Alkohol entspr. 46,7% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 1,04 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 398 ccm 91,8 Vol%igem Rohspiritus = 365,4 ccm reinem Alkohol 16,5 ccm Rückstand. $\alpha_D = -0{,}62°$ (l=2).

Versuch 6: Melassemaische mit einem Zusatz von 40,66 g Ammoniumsulfat = 0,5% N wurde bei 20° in fünf Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 1,2° Säure entspr. 5,4 g Milchsäure im Liter.

Alkoholausbeute: 445 ccm = 351,11 g reiner Alkohol entspr. 47,9% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,69 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 407 ccm 92,9 Vol%igem Rohspiritus = 378,1 ccm reinem Alkohol 16,7 ccm Rückstand. α_D = — 0,42° (l=2).

Versuch 7: Melassemaische mit einem Zusatz von 100 g Ammoniumsulfat = 1,3% N wurde bei 20° in vier Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,5° Säure entspr. 2,25 g Milchsäure im Liter.

Alkoholausbeute: 445 ccm = 351,1 g reiner Alkohol entspr. 47,9% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,39 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 400 ccm 92,8 Vol%igem Rohspiritus = 371,2 ccm reinem Alkohol 12 ccm Rückstand. α_D = — 0,03° (l=0,25).

Versuch 8: Melassemaische mit einem Zusatz von 192,3 g Ammoniumsulfat = 2,5% N wurde bei 19° in fünf Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,8° Säure entspr. 3,6 g Milchsäure im Liter.

Alkoholausbeute: 453 ccm = 357,42 g reiner Alkohol entspr. 48,8% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,2 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 383 ccm 91,2 Vol%igem Rohspiritus = 349,3 ccm reinem Alkohol 16 ccm Rückstand α_D = — 0,05° (l=1).

Versuch 9: Melassemaische mit einem Zusatz von 384,6 g Ammoniumsulfat = 5% N wurde bei 21° in vier Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,81° Säure entspr. 3,65 g Milchsäure im Liter.

Alkoholausbeute: 429 ccm = 338,72 g reiner Alkohol entspr. 46,2% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,86 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 319 ccm 92,8 Vol%igem Rohspiritus = 296 ccm reinem Alkohol 9,9 ccm Rückstand. α_D = —0,24° (l=1).

Versuch 10: Melassemaische mit einem Zusatz von 576,9 g Ammoniumsulfat = 7,5% N wurde bei 21° in vier Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,85° Säure entspr. 3,83 g Milchsäure im Liter.

Alkoholausbeute: 416 ccm = 328,07 g reiner Alkohol entspr. 44,8% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,95 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 333 ccm 86,3 Vol.%igem Rohspiritus = 287,38 ccm reinem Alkohol 9 ccm Rückstand. Dieser sah sehr trübe aus. Nach dem Filtrieren mit Kieselgur sonderte er sich in zwei Schichten, von denen die untere farblose aus kaliumcabonathaltigem Wasser und die obere gelbe, die ein Volumen von 2,4 ccm hatte, aus Fuselöl bestand. Das Fuselöl wurde mittels Scheidetrichter von der wässerigen Pottaschelösung getrennt und polarisiert. $\alpha_D = -0{,}45^0$ (l=0,5).

Versuch 11: Melassemaische mit einem Zusatz von 769,2 g Ammoniumsulfat = 10% N wurde bei 21° in vier Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,86° Säure entspr. 3,87 g Milchsäure im Liter.

Die Spiritusausbeute betrug 407 ccm = 321,12 g reiner Alkohol entspr. 43,8% vom eingemaischten Zucker. Als der nach dreimaliger Destillation erhaltene Rohspiritus mit Kaliumcarbonat getrocknet wurde, wurden 395 ccm 92 Vol.%iger Spiritus von gelblicher Färbung erhalten. Beim Kochen am Rückflußkühler zur Enternung der Kohlensäure ging die Färbung in braunrot über. Die Fuselölbestimmung ergab 1,06 Vol% Fuselöl. Auffallend bei der Bestimmung war, daß die gelbe Färbung des zur Fuselölbestimmung auf 30 Vol% verdünnten Alkohols nach dem Schütteln mit Chloroform sofort von diesem aufgenommen und der Alkohol vollständig farblos wurde.

Zur Untersuchung des Fuselöls wurden 353 ccm 92 Vol.%iger Spiritus = 324,76 ccm reiner Alkohol mit dem Marckwaldschen Apparat destilliert. Der Spiritus färbte sich dabei immer dunkler, so daß der fuselölhaltige Rückstand von 15,7 ccm fast schwarz gefärbt war. Er wurde mit Kieselgur filtriert, ließ sich jedoch wegen der dunklen Färbung auch im 0,25 dcm-Rohr nicht polarisieren. Zur Entfärbung wurde er, um die Konzentration nicht zu ändern, am Rückflußrohr mit gereinigter Blutkohle gekocht und dann von dieser abfiltriert. Die dunkle Färbung blieb jedoch bestehen. Der Rückstand wurde deshalb, um die Polarisierung zu ermöglichen, aus einem kleinen Destillierkolben vollständig destilliert, bis der zurückbleibende Farbstoff zu verkohlen anfing. Das erhaltene farblose Destillat wurde polarisiert. $\alpha_D = -0{,}21^0$ (l=1).

Um festzustellen, ob das Minimum der Fuselölbildung möglicherweise durch einen Stickstoffzusatz, der zwischen 2,5 bis 5 % N liegt, bedingt sein konnte, wurden weitere Gärversuche mit zwischen diesen Mengen liegenden Stickstoffzusätzen angestellt.

Versuch 12: Melassemaische mit einem Zusatz von 230,76 g Ammoniumsulfat = 3 % N wurde bei 20° in vier Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,69° Säure entspr. 3,11 g Milchsäure im Liter. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration mit den Indikator-Dauerreihen nach Michaelis ergab für den Wasserstoffexponenten den Wert $p_H = 5{,}2$. Alkoholausbeute: 435 ccm = 343,01 g reiner Alkohol entspr. 46,8% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,79 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 293 ccm 92,2 Vol%igem Rohspiritus = 270,1 ccm reinem Alkohol 8,5 ccm Rückstand, der sich in zwei Schichten gesondert hatte, deren obere 1,8 ccm aus Fuselöl bestand. Dieses wurde polarisiert. $\alpha_D = -0{,}28°$ (l=0,25).

Versuch 13: Melassemaische mit einem Zusatz von 307,68 g Ammoniumsulfat = 4% N wurde bei 20° in fünf Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,77° Säure entspr. 3,47 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}2$.

Alkoholausbeute: 432,9 ccm = 340,85 g reiner Alkohol entspr. 46,5% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,68 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 350 ccm 91,1 Vol%igem Rohspiritus = 318,8 ccm reinem Alkohol 11,2 ccm Rückstand, davon 2,1 ccm Fuselöl. $\alpha_D = -0{,}28°$ (l=0,25).

Versuch 14: Melassemaische mit einem Zusatz von 211,53 g Ammoniumsulfat = 2,75% N wurde bei 19° in fünf Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,71° Säure entspr. 3,19 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}2$.

Alkoholausbeute: 435 ccm = 343,01 g reiner Alkohol entspr. 46,8% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,71 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 350 ccm 90,8 Vol%igem Rohspiritus = 317,8 ccm reinem Alkohol 16,4 ccm Rückstand, aus zwei Schichten bestehend, davon 1,8 ccm Fuselöl von der Drehung $\alpha_D = -0{,}28°$ (l=0,25).

Versuche zur Feststellung des Einflusses reichlicher Stickstoffdüngung auf die Hefe und den Verlauf der Gärung.

Da in den Gärversuchen von Nr. 8 ab mit steigendem Stickstoffzusatz die Fuselölbildung zunimmt und die Spiritusausbeute abnimmt, wurde festgestellt, welchen Einfluß die Stickstoffgaben über 2,5% N auf die Hefe haben.

Zu diesem Zweck wurden Maischen von der Zusammensetzung wie in den Gärversuchen 8 bis 13 mit einer Reinkultur von Rasse XII beimpft und die Hefe nach vier Tagen mikroskopsich untersucht. Je 20 ccm der Maischen 8 bis 13 werden im Dampftopf sterilisiert

und mit einem ccm einer Aufschwemmung der Reinkultur von Rasse XII in destilliertem Wasser versetzt. In keinem Fall war Gärung festzustellen. Die nachstehende Tabelle enthält die Ergebnisse dieser Versuche.

N-Zusatz in Prozenten der eingemaischten Melasse	Mikroskopische Untersuchung der Hefe nach 4 Tagen
2,5	Sehr wenige stark granulierte Zellen, ganz vereinzelt mit Vakuolen
3,0	Wenige granulierte, schlecht erhaltene Zellen (ca. eine in jedem Gesichtsfeld). Keine Sprossung
4,0	Zellen wie vorstehend, einzelne saftreicher, die meisten aber stark granuliert
5,0	Nur ganz vereinzelt stark granulierte Zellen
7,5	Nur ganz vereinzelt Zellen, die stark granuliert und in Auflösung begriffen sind
10,0	Zellen granuliert und in Auflösung

Eine Kultur derselben Hefe in Bierwürze zeigte nach 24 Stunden lebhafte Gärung und viele Sproßverbände normaler Hefezellen.

Da bei der Beimpfung der Maischen mit einer Reinkultur von Rasse XII überhaupt kein Wachstum der Hefe festzustellen war, was vermutlich daran lag, daß die geringe Menge auf guten Nährböden gezüchteter Hefe abstarb, bevor sie sich an die veränderte Nährlösung gewöhnt hatte, wurden je 50 ccm der Maischen 8 bis 13 mit 2 g Preßhefe zur Gärung angestellt, die abgespaltene Gärungskohlensäure gemessen und beobachtet, wie sich die Hefe verhielt. Das zur Messung der abgespaltenen Kohlensäure angewandte Wägungsverfahren bestand darin, daß die in einem Erlenmayerkolben gärende Flüssigkeit durch ein sog. „Meißl-Ventil" abgeschlossen wurde. Das mit konz. Schwefelsäure gefüllte Gärventil ließ die Kohlensäure passieren, hielt aber den Wasserdampf zurück.

Maische 8 mit 2,5 % N: Wasserstoffionen-Konzentration vor der Gärung p_H = 5,4, nach der Gärung p_H = 5,25. Aussehen der Hefe nach 13 Stunden: Ueberwiegend normale Zellen, vielfach mit Vakuole und teilweise mit Sproßung. Die mikroskopische Auszählung der mit Methylenblau direkt färbbaren Hefezellen ergab 28% tote Zellen. Nach beendeter Gärung (4 Tage) 33% tote Zellen. Abgespaltene Gärungskohlensäure: 2,6272 g.

Maische 12 mit 3% N: Vor der Gärung $p_H = 5{,}4$, nach der Gärung $p_H = 5{,}2$. Aussehen der Hefe nach 13 Stunden: Große, normale Zellen, vielfach mit Vakuole und zum Teil mit gekörntem Plasma. 30% tote Zellen. Nach beendeter Gärung 42% tote Zellen. Abgespaltene Gärungskohlensäure: 2,6004 g.

Maische 13 mit 4% N: Vor der Gärung $p_H = 5{,}4$, nach der Gärung $p_H = 5{,}2$. Aussehen der Hefe nach 13 Stunden: Ueberwiegend normale Zellen, vereinzelt mit Vakuolen, die meisten mit gekörntem Plasma. 30% tote Zellen. Nach beendeter Gärung 43% tote Zellen. Abgespaltene Gärungskohlensäure: 2,5861 g.

Maische 9 mit 5% N: Vor der Gärung $p_H = 5{,}4$, nach der Gärung $p_H = 5{,}35$. Aussehen der Hefe nach 13 Stunden: Vorwiegend normale Zellen, ganz vereinzelt mit Sprossung, dazwischen alte Zellen mit verdickter Membran. 34% tote Zellen. Nach beendeter Gärung 55% tote Zellen. Abgespaltene Gärungskohlensäure: 2,4991 g.

Maische 10 mit 7,5% N: Vor der Gärung $p_H = 5{,}4$, nach der Gärung $p_H = 5{,}2$. Aussehen der Hefe nach 13 Stunden: Zellen ziemlich klein, fast alle mit gekörntem Plasma. 40% tote Zellen. Nach beendeter Gärung 58% tote Zellen. Abgespaltene Gärungskohlensäure: 2,4941 g.

Maische 11 mit 10% N: Vor der Gärung $p_H = 5{,}4$, nach der Gärung $p_H = 5{,}0$. Aussehen der Hefe nach 13 Stunden: Zellen wie bei Maische 10. Plasma erheblich stärker gekörnt. 43% tote Zellen. Nach beendeter Gärung 78% tote Zellen. Abgespaltene Gärungskohlensäure: 2,4934 g.

Die nachstehende Tabelle enthält die Ergebnisse dieser Gärversuche in übersichtlicher Anordnung.

Nachteiliger Einfluß reichlicher Stickstoffdüngung auf die Hefe und den Gärverlauf.

N-Zusatz %	pH vor der Gärung	pH nach der Gärung	Proz. toter Hefezellen nach 13 Stund.	Proz. toter Hefezellen nach 4 Tagen	Abgespaltene Gärungskohlensäure
2,5	5,4	5,2	28	33	2,6272 g
3,0	5,4	5,2	30	42	2,6004 g
4,0	5,4	5,2	30	43	2,5861 g
5,0	5,4	5,35	34	55	2,4991 g
7,5	5,4	5,2	40	58	2,4941 g
10,0	5,4	5,0	43	78	2,4934 g

Auch die Ergebnisse der in größerem Maßstabe unter gleichen Bedingungen ausgeführten Gärversuche wurden in der folgenden Tabelle 3 übersichtlich zusammengestellt. Die Tabelle enthält Angaben über die Menge des Stickstoffzusatzes, die Ausbeuten an Spiritus und seinen Gehalt an Fuselöl. Ferner sind die Drehungswerte des Fuselölrückstandes und daraus berechnet die Drehung des ursprünglichen Fuselöls und sein Gehalt an d-Amylalkohol verzeichnet.

Tabel-

Beeinflussung der Alkoholausbeuten, sowie der Bildung von niumsulfat bei der Melassegärung. Zusammensetzung der Maischen: Schwefelsäure mit Leitungs-

Gär-versuch Nr.	% zugesetzter Stickstoff bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse	Spiritusausbeuten			Fuselöl Vol. % in 100%ig. Alkohol
		reiner Alkohol		Gew. % vom eingemaischten Zucker	
		ccm	g		
4	0	433	341,64	46,6	1,12
5	0,0386	434	342,43	46,7	1,04
6	0,5	445	351,11	47,9	0,69
7	1,3	445	351,11	47,9	0,39
8	2,5	453	357,42	48,8	0,20
14	2,75	435	343,01	46,8	0,71
12	3,0	435	343,01	46,8	0,79
13	4,0	432 9	340,85	46,5	0,86
9	5,0	429	338,72	46,2	0,86
10	7,5	416	328,07	44,8	0,95
11	10,0	407	321,12	43,8	1,06

Tafel 3.

Fuselöl und dessen Zusammensetzung durch Zusätze von Ammo-
1630 g Klettendorfer Melasse, 6 g 17%iges Superphosphat, 2,04 g konz.
wasser zu 7 Litern aufgefüllt.

Fuselöl absolute Menge ccm	Bei der Destillation verbliebener fuselölhaltiger Rückstand und dessen Drehung, l = 1	Fuselöl im Rückstand		
		ccm	Drehung α_D; l=1	% Gehalt an d-Amyl-alkohol
4,85	aus 344,8 ccm rein. Alkohol 13,8 ccm $\alpha_D = -0{,}42^0$	3,9	— 1,46°	30 3
4,51	aus 365,4 ccm r. A 16,5 ccm $\alpha_D = -0{,}31^0$	3,8	— 1,34°	27,9
3,07	aus 378,1 ccm r. A 16,7 ccm $\alpha_D = -0{,}21^0$	2,6	— 1,33°	27,6
1,73	aus 371,2 ccm r. A. 12 ccm $\alpha_D = -0{,}13^0$	1,4	— 1,19°	24,8
0,91	aus 349,3 ccm r. A. 16 ccm $\alpha_D = -0{,}05^0$	0,7	— 1,19°	24,8
3,09	aus 317,8 ccm r. A. 1,8 ccm $\alpha_D = -1{,}11^0$	1,8	— 1,11°	23,1
3,44	aus 270,1 ccm r. A. 1,8 ccm $\alpha_D = -1{,}11^0$	1,8	— 1,11°	23,1
3,72	aus 318,8 ccm r. A 2,1 ccm $\alpha_D = -1{,}11^0$	2,1	— 1,11°	23,1
3,69	aus 296 ccm r. A. 9,9 ccm $\alpha_D = -0{,}24^0$	2,5	— 0,96°	19,8
3,95	aus 287,38 ccm r. A. 2,4 ccm $\alpha_D = -0{,}90^0$	2,4	— 0,90°	18,7
4,31	aus 324,67 ccm r. A. 15,7 ccm $\alpha_D = -0{,}21^0$	3,4	— 0,96°	19,8

2. Gärversuche mit Melasse unter Zusatz von Ammoniumcarbonat.

Nachdem bei den Melassegärversuchen mit Stickstoffzusätzen in Form von Ammoniumsulfat Gesetzmäßigkeiten zwischen Spiritusausbeuten, Fuselölbildung, sowie Gehalt des gebildeten Fuselöls an d-Amylalkohol festgestellt wurden, interessierte die Frage, ob diese gesetzmäßigen Beziehungen auch bei Düngung der Maischen mit anderen anorganischen Stickstoffverbindungen zu beobachten sind. Zur Klärung dieser Frage wurde eine Reihe von Gärversuchen mit verschiedenen Stickstoffgaben in Form von Ammoniumcarbonat angestellt.

Da das Ammoniumcarbonat des Handels meistens ein Gemisch von primärem Ammoniumcarbonat NH_4HCO_3 mit dem sekundären Salz $(NH_4)_2CO_3$ und mit carbaminsaurem Salz $NH_2 . COONH_4$ ist, wurde zunächst der Ammoniakgehalt des zu den Versuchen verwendeten Ammoniumcarbonats festgestellt. Dieser betrug 31,7% $NH_3 = 26{,}1\%$ N.

Versuch 15: Melassemaische von derselben Melasse aus Klettendorf und gleicher Zusammensetzung wie in den vorstehenden Versuchen mit einem Zusatz von 3 g Ammoniumcarbonat = 0,0484% N wurde in fünf Tagen bei 20° vergoren.

Die Säurebestimmung in der Maische vor der Gärung ergab 0,28° Säure entspr. 1,26 g Milchsäure im Liter. $p_H = 6{,}4$.

Nach 13 Stunden wurde mit dem Platindraht eine Probe der Hefe aus der gärenden Maische herausgenommen und mikroskopisch untersucht: Normale, saftreiche Zellen, zum großen Teil mit Vacuolen. Plasma wenig gekörnt. 13% tote Zellen.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,46° Säure entspr. 2,07 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}8$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Normale Zellen, vereinzelt mit etwas gekörntem Plasma. 27% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 434 ccm = 342,43 g reiner Alkohol entspr. 46,7% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 1,02 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: Aus 318 ccm 92,1 Vol%igem Rohspiritus = 292,9 ccm reinem Alkohol 13,3 ccm Rückstand, davon 2,85 ccm Fuselöl von der Drehung $\alpha_D = -0{,}33°$ (l=0,25).

Versuch 16: Melassemaische mit einem Zusatz von 30,97 g Ammoniumcarbonat = 0,5% N wurde bei 20° in fünf Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung vor der Gärung ergab 0,12° Säure entspr. 0,54 g Milchsäure im Liter. $p_H = 6{,}8$.

Untersuchung der Hefe nach 15 Stunden: Normale, saftreiche Zellen. Plasma wenig gekörnt. Einzelne Zellen granuliert und mit verdickter Membran. 19% tote Zellen.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,23° Säure entspr. 1,04 g Milchsäure im Liter. $p_H = 6{,}3$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen zum Teil mit Vacuolen, die meisten mit etwas gekörntem Plasma. Einzelne Stäbchen. 35% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 442,5ccm = 349,13 g reiner Alkohol entspr. 47,6% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,67 Vol%. Untersuchung des Fuselöls: Aus 340 ccm 88,3 Vol%igem Rohspiritus = 300,2 ccm reinem Alkohol 12,2 ccm Rückstand, davon 1,8 ccm Fuselöl von der Drehung $\alpha_D = -0{,}31°$. (l=0,25.)

Gärversuche mit Melasse aus der Zuckerfabrik Rosenthal.

Da die Klettendorfer Melasse verbraucht war, mußten die folgenden Gärversuche mit Melasse aus der Zuckerfabrik Rosenthal angestellt werden. Diese Melasse wurde zunächst untersucht. Sie zeigte in der Zusammensetzung nur geringe Abweichungen von der Klettendorfer Melasse.

Die Polarisierung ergab 46,0% Zuckergehalt, die Untersuchung auf scheinbaren Trockensubstanzgehalt 80° Brix bei 20° C. Daraus ergibt sich der Reinheitsquotient zu 57,5. Die Melasse reagierte alkalisch. 20 g verbrauchten bis zur sauren Reaktion gegen Lackmus 7,6 ccm n/10 Schwefelsäure.

Stickstoffbestimmung in der Melasse nach Stoltzenberg[29]):

1.) 2,6607 g Melases verbrauchten 27,0 ccm n/10 Schwefelsäure;
2.) 3,0437 g Melasse verbrauchten 31,8 ccm n/10 Schwefelsäure.

Gefunden: 1.) 1,421% N, 2.) 1,464% N.

Da die Melasse mehr Zucker enthielt als die Klettendorfer, wurden in den folgenden Gärversuchen, um den gleichen Zuckergehalt in den Maischen zu haben, 1595 g Melasse zu 7 Litern aufgefüllt.

Um festzustellen, ob die Rosenthaler Melasse bei der Gärung sich so wie Klettendorfer verhält, wurde zunächst ein Gärversuch ohne jeden Stickstoffzusatz angestellt.

Versuch 17: Rosenthaler Melassemaische, die wegen ihrer stärkeren Alkalität als die Klettendorfer mit 3,03 g konz. Schwefel-

[29]) Stoltzenberg: Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerindustrie 62, 444 (1912).

säure angesäuert war, wurde ohne jeden Stickstoffzusatz bei 20° in sieben Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung vor der Gärung ergab 0,4° Säure entspr. 1,80 g Milchsäure im Liter. p_H=6,0.

Untersuchung der Hefe nach 13 Stunden: Normale, saftreiche Zellen, vielfach mit Vacuole. Wenig gekörntes Plasma. 12,5% tote Zellen.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,81° Säure entspr. 3,65 g Milchsäure im Liter. p_H = 5,4.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen stark granuliert, bisweilen mit deutlich sich abhebender Membran. 55% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 443ccm = 349,53 g reiner Alkohol entspr. 47,6% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 1,02 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 390 ccm 91,5 Vol.%igem Rohspiritus = 356,8 ccm reinem Alkohol 19,1 ccm Rückstand, davon 3,4 ccm Fuselöl von der Drehung $\alpha_D = -0{,}33°$ (l=0,25).

Versuch 18: Melassemaische mit einem Zusatz von 61,94 g Ammoniumcarbonat = 1% N wurde bei 20° in sieben Tagen vergoren.

Vor der Gärung p_H = 7,4. Die Maische war schwach alkalisch. Trotzdem setzte nach kurzer Zeit eine intensive Gärung ein.

Untersuchung der Hefe nach 13 Stunden: Gut aussehende Zellen, fast alle mit Vakuole. Viel Sprossung. 9% tote Zellen.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,36° Säure entspr. 1,62 g Milchsäure im Liter. p_H = 6,2.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen etwas granuliert, die meisten aber gut erhalten. Zellen mit sichtbarer Membran nur vereinzelt. 70% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 417 ccm = 329,01 g reiner Alkohol entspr. 44,9% vom eingemaischten Zucker. Der erhaltene Spiritus war gelb gefärbt und hatte einen unangenehmen, penetranten Geruch. Die Fuselölbestimmung ergab 1,4 Vol.% Fuselöl. Auffallend bei der Bestimmung war, daß die gelbe Färbung und zum Teil auch der penetrante Geruch nach dem Schütteln mit Chloroform von diesem aufgenommen wurden.

Zur Untersuchung des Fuselöls wurden 320 ccm 91,1 Vol.%iger Rohspiritus = 291,52 ccm reiner Alkohol vorsichtig destilliert, bis das Thermometer 79° C. zeigte. Der Rückstand, 22 ccm, wurde mit Kieselgur filtriert, jedoch blieb die Flüssigkeit trübe und undurchsichtig und ließ sich auch im 0,25 dcm-Rohr nicht polarisieren.

Da der Spiritus aus dem Gärversuch 18, wie aus Färbung und Geruch hervorging, stark verunreinigt war, und deshalb auch die Fuselölbestimmung einen abnorm hohen Wert ergab, wurde der Gärversuch nochmals angestellt und die durch den Ammoniumcarbonat-

zusatz bedingte alkalische Reaktion durch Zusatz von Phosphorsäure beseitigt.

Versuch 19: Melassemaische von der Zusammensetzung wie in Versuch 18 wurde mit 18 g Phosphorsäure (s . 1,153) neutralisiert und bei 20° in fünf Tagen vergoren.

p_H vor der Gärung = 7,15.

Untersuchung der Hefe nach 16 Stunden: Normale, saftreiche Zellen, vielfach mit Vakuole und Sprossung. 22% tote Zellen.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,72° Säure entspr. 3,4 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5,4$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen sämtlich granuliert und zum Teil geschrumpft und mit abgelöster Membran. Vereinzelt Milchsäurebakterien. 78% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 427,5 ccm = 337,3 g reiner Alkohol entspr. 46,2% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,64 Vol.%.

Zum Entwässern des Rohspiritus wurde an Stelle von Kaliumcarbonat wasserfreies Kupfersulfat verwendet. Dadurch wurde 96,4 Vol.%iger Spiritus erhalten.

Untersuchung des Fuselöls: aus 325 ccm 96,4 Vol.%igem Rohspiritus = 313,5 ccm reinem Alkohol 6 ccm Rückstand, von der Drehung $\alpha_D = -0,17^0$ (l=0,5).

Versuch 20: Melassemaische mit einem Zusatz von 154,85 g Ammoniumcarbonat = 2,5% N wurde mit 49 g Phosphorsäure neutralisiert und bei 19° in vier Tagen vergoren.

p_H vor der Gärung = 7,2.

Untersuchung der Hefe nach 12 Stunden: Normale, saftreiche Zellen, zum größten Teil mit Vakuolen, ganz vereinzelt mit gekörntem Plasma. 20% tote Zellen.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,52° Säure entspr. 2,34 g Milchsäure im Liter. $p_H = 6,4$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: ziemlich große, meistens etwas granulierte Zellen. 66,7% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 432 ccm = 340,84 g reiner Alkohol entspr. 46,5% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,44 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 390 ccm 94 Vol.%igem Rohspiritus = 310,2 ccm reinem Alkohol 7,4 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0,09^0$ (l=0,5).

Die Ergebnisse dieser Gärversuche sind in der Tabelle 4 übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle 4

Beeinflussung der Alkoholausbeuten, sowie der Bildung von Fuselöl und dessen Zusammensetzung durch Zusätze von Ammoniumkarbonat.

Zusammensetzung der Maischen: 1630 g Klettendorfer bezw. 1595 g Rosenthaler Melasse, 6 g 17%iges Superphosphat 2,04 bezw. 3,03 g konz, Schwefelsäure mit Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt.

Gärversuch Nr.	In Form von Ammoniumkarbonat zugesetzte % N, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse	Spiritusausbeuten: rein. Alkohol ccm	Spiritusausbeuten: rein. Alkohol g	Spiritusausbeuten: Gew. % vom eingemaischt. Zucker	Fuselöl: Vol. % in 100% Alkoh.	Fuselöl: absolute Menge ccm	Bei der Destillation verbliebener fuselölhaltig. Rückstand u. dessen Drehung α_D l=1	Fuselöl in diesem Rückstand: ccm	Fuselöl in diesem Rückstand: Drehung α_D : l—1	Fuselöl in diesem Rückstand: % Gehalt an d-Amylalkohol	Bemerkungen
15	0,0484	434	342,43	46,7	1,02	4,42	aus 292,9 ccm reinem Alkohol 2,85 ccm $\alpha_D = -1,32^0$	2,85	$-1,32^0$	27,4	Melasse aus Klettendorf Kampagne 1921
16	0,5	442,5	349,13	47,6	0,67	2,96	aus 300,2 ccm reinem Alkohol 1,8 ccm $\alpha_D = -1,25^0$	1,8	$-1,25^0$	25,9	
19	1,0	427,5	337,3	46,2	0,64	2,73	aus 313,3 ccm reinem Alkohol 6 ccm $\alpha_D = -0,35^0$	2,0	$-1,04^0$	21,6	Melasse aus Rosenthal Kampagne 1922
20	2,5	432	340,84	46,5	0,44	1,90	aus 310,2 ccm reinem Alkohol 7,4 ccm $\alpha_D = -0,17^0$	1,3	$-0,99^0$	20,5	

III. Fuselölbildung bei der Melassegärung unter Zusatz anorganischer und organischer Stickstoffverbindungen, für sich und im Gemisch, mit und ohne Lüftung.

Von den in Abschnitt II erhaltenen Resultaten bei der Vergärung von Melasse unter Zusatz von Ammoniumsulfat mußten besonders die Versuche 4 bis 6 Interesse erregen. Vergleichen wir die in Tabelle 1 von den Fabriken gemachten Angaben über die Zusammensetzung der Maischen und über die Fuselölausbeuten aus dem Rohspiritus, so zeigt sich, daß die größte Ausbeute an Fuselöl (Versuch 4: 1,12 Vol.% auf absoluten Alkohol berechnet) bei der Vergärung einer Maische ohne jeden Stickstoffzusatz erhalten worden ist. Hier zeigte das Fuselöl auch den relativ höchsten Gehalt an d-Amylalkohol entsprechend dem Maximalgehalt an d-Amylalkohol in den Amylalkoholfraktionen der Fuselölproben Ic und V, das heißt der Fabriken, die entweder gar keine, oder nur äußerst minimale Stickstoffzusätze vor der Gärung gemacht haben. Schon bei einem Stickstoffzusatz von 0,04% auf die Menge der eingemaischten Melasse berechnet, ist ein wenn auch geringer, so doch merkbarer Einfluß auf die Bildung des Fuselöls festzustellen, dessen Menge etwas abgenommen hat, ebenso wie der Gehalt an d-Amylalkohol merkbar zurückgegangen ist. Noch deutlicher prägt sich diese Beeinflussung der Fuselölbildung bei Zusatz von 0,5% Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat zur gärenden Melasse aus, wobei ein Rückgang der Fuselölmenge auf etwa 60% zu beobachten war.

Die Gärversuche 4 und 5 entsprechen den Verhältnissen der Arbeitsweise in den Melassebrennereien, während Versuch 6, eventuell auch noch Versuch 7, den Bedingungen der Gärung in den Preßhefefabriken einigermaßen nahe kommen würde. Während Versuch 6 mit 0,5% anorganischem Stickstoff einen deutlichen Aufstieg in der Spiritusausbeute, dagegen wie erwähnt eine Herabminderung der Fuselölmenge auf etwa 60% des ursprünglich bei Vergärung von reiner Melasse erzielten Ertrages brachte, sank die absolute Fuselölmenge der Melasse bei Zusatz von 1,3% anorganischem Stickstoff auf etwa 25% der ursprünglichen Ausbeute, und konform damit war auch die Drehung des Fuselöls bezw. sein Gehalt an d-Amylalkohol ein wesentlich geringerer geworden.

Nun wird aber unter den heutigen Verhältnissen in den Melassegärbetrieben, die Preßhefe herstellen, zur besseren Aufzucht der Hefe die Melasse nicht mit reiner anorganischer Stickstoffnahrung versetzt, sondern der Stickstoff zumeist auch als organischer in Form

von Malzkeimen der Hefe dargereicht. In den letzten Jahren haben sich die Verhältnisse insofern wesentlich geändert, als die Mehrzahl der Fabriken zum Zwecke der Ersparnis der relativ teuren Malzkeime nach dem von Wohl und Scherdel gefundenen Verfahren[17]) einen gewissen Teil des organischen Stickstoffs der Malzkeime durch anorganischen Stickstoff, besonders durch Ammoniaksalze, ersetzt.

Um nun Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, in welchem Maße unter den gegenwärtigen Verhältnissen der Gärpraxis in den Melassepreßhefefabriken die Menge und Zusammensetzung des Fuselöls beeinflußt wird, wurde eine große Anzahl von Gärversuchen angestellt, in denen Melasse mit steigenden Quantitäten organischen Stickstoffs in Form von Malzkeimen für sich sowie im Gemisch mit Ammoniumsulfat in wechselnden Mengenverhältnissen zum Teil ohne, zum Teil mit Lüftung der Maischen vergoren wurde. (Tabellen 5 und 6). Die Resultate der Gärversuche 17 und 21 bis 24 zeigen wieder, daß proportional der zugesetzten Stickstoffmenge, die dieses Mal in Form des organischen Stickstoffs der Malzkeime gegeben wurde, ein Sinken der Fuselölausbeute stattfand, die von 1,02% im absoluten Alkohol auf 0,62% bei einem Zusatz von 0,67% organischen Stickstoffs zurückging. Die Alkoholausbeute stieg merkwürdigerweise gegenüber der aus reiner Melasse erhaltenen bei sehr geringem Stickstoffzusatz von 0,05% N um etwa 3% und blieb dann bei weiteren Zusätzen im wesentlichen konstant.

Analog der Fuselölausbeute ging auch mit steigendem Stickstoffzusatz der Malzkeime die optische Drehung des Fuselöls und dementsprechend auch der Gehalt an d-Amylalkohol deutlich zurück, was ohne weiteres dadurch seine Erklärung findet, daß die Leucine der Melasse durch die mit den Malzkeimen zugesetzten anderen Aminosäuren vor der Assimilation durch die Hefe in steigendem Maße geschützt wurden.

Um die Fuselölbildung bei der in den Melassepreßhefefabriken üblichen Gärung mit Lüftung untersuchen zu können, wurde eine Reihe von Gärversuchen angestellt, bei denen unter sterilen Bedingungen mittels der Wasserstrahlpumpe 24 bis 38 cbm Luft durch die gärenden Melassemaischen (3,5 und 7 Liter) gesaugt wurden (Tab. 6). Bei sämtlichen Gärversuchen mit Lüftung war eine beträchtliche Hefenvermehrung zu beobachten. Im Versuch 28, bei dem der Maische 0,05% N, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse, in Form von Ammoniumsulfat zugesetzt waren, und der in 96,5 Stunden mit 30,5 cbm gelüftet worden war, betrug der Zuwachs an frisch gebildeter Hefe 106,46%, während eine ohne Lüftung vergorene Maische derselben Zusammensetzung nur einen Zuwachs von 5,8% neugebildeter Hefe aufzuweisen hatte.

Der Fuselölgehalt des aus diesen gelüfteten Maischen gewonnenen Spiritus wies nur ganz minimale Abweichungen von dem aus den

entsprechenden Gärversuchen ohne Lüftung gewonnenen auf. Da aber die Spiritusausbeute um 50% und mehr abgenommen hatte, war die absolute Menge des bei der Gärung gebildeten Fuselöls erheblich zurückgegangen. Es erwies sich bei diesen Versuchen als vollständig gleichgültig, ob der Maische der Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat oder Malzkeimauszug zugesetzt wurde, immer unterlag die Gärung in Bezug auf Fuselölbildung denselben Gesetzmäßigkeiten wie bei den entsprechenden Gärversuchen ohne Lüftung, während die Spiritusausbeuten mit der Dauer und Intensität der Lüftung abnahmen. Auch Gärversuche mit gemischten anorganischen und organischen Stickstoffgaben in Form von Ammoniumsulfat und Malzkeimauszügen, nach Art der von Wohl und Scherdel [17]) angestellten, die darauf ein technisches Verfahren zur Gewinnung von gärkräftiger Preßhefe im Dauerbetrieb begründeten, zeigten von dem gesetzmäßigen Einfluß der Stickstoffgaben auf den Fuselölgehalt des Spiritus keine Abweichung, sondern in allen diesen Gärversuchen wurde stets beobachtet, daß, je mehr Stickstoffsubstanzen zugesetzt waren, fast proportional die Fuselölmenge entsprechend abnahm. Auch zeigte ferner die Drehung des Fuselöls und demzufolge auch der Gehalt an d-Amylalkohol eine deutliche Abnahme, je größer der Stickstoffzusatz war.

Wie in der Praxis der Preßhefefabriken seit langer Zeit bekannt ist, werden bei so starker Lüftung der Nährwürzen, wie sie in diesen Betrieben stattfindet, beträchtlich geringere Mengen von Alkohol neben sehr viel neuer Hefensubstanz gewonnen. Diese Tatsache ergibt sich auch aus den folgenden Versuchen, die deutlich ein Heruntergehen der Alkoholausbeute auf durchschnittlich ein Drittel der Alkoholausbeuten bei den Versuchen ohne Lüftung bei gleichbleibender Stickstoffernährung erkennen lassen. Bemerkenswert war nun, daß ganz analog dieser verringerten Alkoholproduktion die jedesmal entstandene Fuselölmenge entsprechend herabgemindert war auf etwa den dritten oder vierten Teil, das heißt also auf Zahlen von ungefähr derselben Größenordnung.

Offenbar werden bei Aufzucht der Hefe unter starker Lüftung die Kohlehydrate in größerem Maßstab zur Bildung von Hefensubstanz verwertet, indem ein größerer Teil des Zuckers für die Eiweißassimilation der Hefe und für ihre Glykogenbildung benutzt wird, so daß nur ein relativ kleiner Teil des Zuckers zu Alkohol vergoren wird. Auch liegt die Möglichkeit vor, daß Alkohol oder der als Zwischenprodukt auftretende Acetaldehyd durch die starke Lüftung Oxydationen zu Säuren, wie Essigsäure oder sogar Kohlensäure erfährt.

Entsprechend der geringen Menge von Zucker, die bei der Lüftung der Maischen zur Vergärung auf Alkohol zur Verfügung steht, muß naturgemäß auch die absolute Menge des entstandenen

Fuselöls eine geringere sein, denn der Abbau der Leucine geht, wie aus früheren Arbeiten F. Ehrlichs bekannt ist, nur vor sich, wenn die Hefe genügend überschüssigen Zucker vorfindet, den sie gleichzeitig zu Alkohol vergärt. Werden den Hefezellen neben den Aminosäuren nur geringe Mengen von Zucker zur Verfügung gestellt, so greifen sie die Leucine entsprechend weniger an, und in gleichem Maße wird auch weniger Fuselöl gebildet.

Der niedrigere Fuselölgehalt in dem Spiritus aus den gelüfteten Maischen läßt sich weiterhin dadurch erklären, daß infolge der intensiveren Ausnutzung der Stickstoffzusätze durch die im Sauerstoffstrom stärker wachsende Hefe weniger Leucine der Melasse, sowie auch des Hefeneiweißes angegriffen werden. Auch hier kommt in Betracht, daß ein Teil des ursprünglich entstandenen Amylalkohols oder seines Zwischenproduktes, des Valeraldehyds, in Gegenwart des überschüssigen Luftsauerstoffes durch oxydiernde Fermente eine Oxydation zu Valeriansäure erfahren haben kann, die entweder als solche, oder in Esterform entstanden, bei der Destillation des Rohspiritus mit Alkali in das Fuselöl nicht mit übergegangen ist. Schließlich wäre auch noch hervorzuheben, daß eine Verminderung des Ertrages an Alkohol und Fuselöl in gelüfteten Maischen durch die stärkere Verdunstung der Alkohole infolge des starken Durchleitens der Luft eintreten kann.

---

1. Gärversuche mit Melasse und Malzkeimauszügen.

Die folgenden Gärversuche wurden in der Weise angestellt, daß 1595 g Melasse, die 733 g, d. h. ebensoviel Zucker wie die in den vorigen Versuchen beschriebenen Gäransätze enthielten, mit 6 g 17%igem Superphosphat sowie mit Malzkeimauszügen in wechselnden Mengen versetzt mit Leitungswasser zu 7 Litern Flüssigkeit aufgefüllt, mit 3,03 g konz. Schwefelsäure angesäuert und mit 150 g Konstädter Brennereipreßhefe vergoren wurden.

Aus den vergorenen Maischen wurde nach Zusatz von Schwefelsäure im Ueberschuß unter Verwendung eines Birektifikators der gebildete Alkohol abdestilliert. Das Destillat wurde mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und nochmals destilliert. Nach einer dritten Destillation stellte man die Spiritusausbeute und den Fuselölgehalt fest. Nach weiterer Konzentrierung durch eine vierte Destillation wurde der erhaltene Rohspiritus mit wasserfreiem Kupfersulfat weiter entwässert. Dem auf diese Weise erhaltenen hochprozentigen Spiritus wurde durch Destillation mit dem Marckwaldschen Apparat das Fuselöl entzogen, das man im Destillationsrückstand polarimetrisch untersuchte.

Der zu den nachstehenden Gärversuchen verwendete Malzkeimauszug wurde wie folgt hergestellt: 630 g von der Breslauer Aktien-Malzfabrik gelieferte Malzkeime, die von nach Pilsener Art abgedarrtem Malz stammten, wurden mit 10 Litern destilliertem Wasser eingeteigt, im Wasserbad eine Stunde auf 40—50° C. und dann drei Stunden lang auf 62—63° erwärmt. Darauf wurde koliert und die kolierte Lösung drei Stunden im Dampftopf erhitzt und dann filtriert.

Der auf diese Weise erhaltene Auszug hatte das spezifische Gewicht 1,0137 und einen Trockensubstanzgehalt von 3,6° Balling bei 19° C.

Eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab aus 3,0912 g Malzkeimauszug eine Menge von Ammoniak, die 3,8 ccm n/10 Schwefelsäure bezw. 0,1722% N entsprach. Demnach enthält 1 Liter = 1013,7 g Malzkeimauszug 1,746 g N.

Versuch 21: Melassemaische obiger Zusammensetzung, die ohne Zusatz von Wasser nur mit 6,09 Litern Malzkeimauszug = 0,666% N zu 7 Litern aufgefüllt war, wurde bei 20° in sechs Tagen vergoren.

Die Säurebestimmung in der Maische vor der Gärung ergab 0,28° Säure entspr. 1,26 g Milchsäure im Liter. $pH = 5,4$.

Untersuchung der Hefe nach 42 Stunden: Große, zum Teil schwach granulierte Zellen, ganz vereinzelt mit verdickter Membran. 11,2% tote Zellen.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,94° Säure entspr. 4,23 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}2$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Schlecht erhaltene Zellen, granuliert, bisweilen mit abgelöster Membran. Vereinzelt Bakterien. 75% tote Zellen. 17% kleine, runde torulaartige Zellen.

Alkoholausbeute: 451 ccc = 355,84 g reiner Alkohol entspr. 48,5% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,62 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 320 ccm 92,7 Vol.%igem Rohspiritus = 296,64 ccm reinem Alkohol 11,4 ccm fuselölhaltiger Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}17^0$ (l=1).

Die bei der mikroskopischen Untersuchung der Hefe festgestellten, kleinen, runden Zellen, die auch vor der Gärung schon in der käuflichen Preßhefe waren, konnten möglicherweise Torulahefen sein und die Gärung und Fuselölbildung beeinflussen. Es wurde deshalb festgestellt, ob die beobachteten kleinen, runden Zellen deformierte Kulturhefen oder Torulaceen waren.

Zu diesem Zweck wurde die zu diesen Gärversuchen verwendete Konstädter Brennereipreßhefe biologisch untersucht. Dabei wurde wie folgt verfahren: Eine Probe der Hefe wurde in 10%ige Rohrzuckerlösung mit einem Zusatz von 4% Weinsäure eingeimpft. Wie durch Versuche festgestellt, sind bekanntlich die Kulturhefen gegen eine 4%ige Weinsäurelösung viel weniger widerstandsfähig, als die wilden Hefen, sowie die Torula- und Mykodermaarten. Die Kulturhefen sterben je nach dem Zustand, in welchem sie sich befinden, entweder völlig ab, oder ihr Vermehrungsvermögen wird stark geschwächt. Auch weniger kräftige Zellen von wilder Hefe, Torula usw. mögen wohl durch die Weinsäurebehandlung leiden, einzelne selbst abgetötet werden, immerhin ist aber ihr Vermehrungsvermögen nicht so stark beeinflußt, wie das der Kulturhefen.

Nachdem die Hefe 48 Stunden im Hansenkölbchen bei 25° C. in der Weinsäure-Saccharoselösung geblieben war, wurde sie in gehopfte Bierwürze übergeführt. Dadurch wurden die Torula- und wilden Hefen in der Entwicklung begünstigt und häuften sich dadurch an. Auch die anderen als Verunreinigung neben wilden Hefen vorhandenen Sproßpilze traten mehr in den Vordergrund. Durch diese Methode ließen sich sehr geringe Mengen der genannten Organismen nachweisen.

Nachdem die Hefe 24 Stunden bei 25° C. in der an stickstoffhaltigen Körpern reichen Bierwürze verblieben war und dadurch den Höhepunkt der Sproß- und Gärtätigkeit erreicht hatte, wurde sie mikroskopisch untersucht. Als einzige Verunreinigungen wurden dabei festgestellt: Oidium lactis, Schimmelpilze und Essigsäure-

bakterien. Torulahefen waren nicht nachzuweisen. Die Hefe war also in technischem Sinne als rein anzusprechen.

Versuch 22: Melassemaische mit einem Gehalt von 5 Litern Malzkeimauszug = 0,547% N wurde bei 20° in fünf Tagen vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,28° entspr. 1,26 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}4$.

Untersuchung der Hefe nach 13 Stunden: Große, gesunde Zellen. 9,1% tote Zellen.

Säure in der vergorenen Maische: 0,82° entspr. 3,69 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}2$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen mit gekörntem Plasma, die meisten ohne Vakuole. Vereinzelte Bakterien. 15,4% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 451 ccm = 355,84 g reiner Alkohol entspr. 48,5% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,64 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 410 ccm 93,4 Vol.%igem Rohspiritus = 382,94 ccm reinem Alkohol 16,5 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}31°$ (l=2).

Versuch 23: Melassemaische mit einem Gehalt von 1 Liter Malzkeimauszug = 0,1094% N wurde bei 20° in vier Tagen vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,21° entspr. 0,95 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}4$.

Untersuchung der Hefe nach 14 Stunden: Zellen meistens granuliert, selten mit Vakuole. 27% tote Zellen.

Säure nach der Gärung: 0,59° entspr. 2,66 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}3$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Ziemlich gut erhaltene Zellen, wenig gekörnt, vielfach mit Vakuole. 53% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 454 ccm = 358,21 g reiner Alkohol entspr. 48,9% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,87 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 420 ccm 92,8 Vol.%igem Rohspiritus = 389,76 ccm reinem Alkohol 19,5 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}42°$ (l=2).

Versuch 24: Melassemaische mit einem Gehalt von 0,5 Liter Malzkeimauszug = 0,0547% N wurde bei 23° in vier Tagen vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,2° entspr. 0,90 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}4$.

Untersuchung der Hefe nach 15 Stunden: Zellen gut erhalten, nur zu einem geringen Teil granuliert, oft mit Vakuole. 25% tote Zellen.

Säure nach der Gärung: 1,4° entspr. 6,30 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}0$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen granuliert, vereinzelt mit verdickter Membran. Einige Zellen mit Vakuole. 46% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 455 ccm = 358,99 g reiner Alkohol entspr. 49,0% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,93 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 370 ccm 94,3 Vol.%igem Rohspiritus = 348,9 ccm reinem Alkohol 19 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}45^0$ (l=2).

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5

Gärversuche mit Melasse bei Stickstoffdüngung in Form von Malzkeimauszügen.

Zusammensetzung der Maischen:

1595 g Rosenthaler Melasse, 6 g 17 %iges Superphosphat wurden mit Malzkeimauszügen in wechselnden Mengen und Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt, mit 3,03 g konz. Schwefelsäure angesäuert und mit 150 g Preßhefe vergoren.

Gärversuch Nr.	In Proz. der Melasse in Form von Malzkeimauszügen zugesetzter Stickstoff	Spiritusausbeuten: rein. Alkohol ccm	Spiritusausbeuten: rein. Alkohol g	Spiritusausbeuten: Gew. % v. eingemaischt. Zucker	Fuselöl: Vol. % in 100 % Alkoh.	Fuselöl: absolute Menge ccm	Bei der Destillation verbliebener fuselölhaltiger Rückstand und dessen Drehung l=1	Fuselöl in diesem Rückstand: ccm	Fuselöl in diesem Rückstand: Drehung α_D: l=1	Fuselöl in diesem Rückstand: % Gehalt an d-Amylalkohol
21	0,666	451	355,84	48,5	0,62	2,79	aus 296,6 ccm reinem Alkohol 11,4 ccm $\alpha_D = -0,17^0$	1,8	$-1,09^0$	22,7
22	0,547	451	355,84	48,5	0,64	2,88	aus 382,9 ccm reinem Alkohol 16,5 ccm $\alpha_D = -0,16^0$	2,4	$-1,06^0$	22,1
23	0,1094	454	358,21	48,9	0,87	3,95	aus 389,8 ccm reinem Alkohol 19,5 ccm $\alpha_D = -0,21^0$	3,3	$-1,22^0$	25,5
24	0,0547	455	358,99	49,0	0,93	4,23	aus 348,9 ccm reinem Alkohol 19,0 ccm $\alpha_D = -0,23^0$	3,2	$-1,26^0$	26,2
17	0	443	349,53	47,6	1,02	4,52	aus 356,8 ccm reinem Alkohol 3,4 ccm $\alpha_D = -1,32^0$	3,4	$-1,32^0$	27,4

2. Gärversuche mit Lüftung.

Die folgenden Gärversuche mit Lüftung wurden in der Weise angestellt, daß die von der Wasserstrahlpumpe angesaugte Luft zunächst durch eine mit einem Luftfilter versehene Gasuhr, wo sie gemessen wurde, und dann durch ein bis auf den Boden der Gärflasche mit der Maische reichendes Glasrohr zur Wasserstrahlpumpe ging. Bei jedem Versuch wurde die Sperrflüssigkeit aus dem Gärverschluß vor der Destillation mit der vergorenen Maische vereinigt, um nach Möglichkeit die beim Durchleiten sich verflüchtigenden Mengen von Alkohol und Fuselöl wiederzugewinnen.

Um ein Ueberlaufen der stark schäumenden Maische zu verhüten, konnte die 10 Liter-Gärflasche nur zu einem Drittel mit Maische gefüllt und deshalb nur 3,5 Liter Maische zur Gärung angestellt werden.

Zunächst wurde die Melasse bei Lüftung ohne jeden Stickstoffzusatz vergoren.

Versuch 25: 797,5 g Melasse wurden mit Leitungswasser zu 3,5 Litern aufgefüllt, mit 3 g 17%igem Superphosphat versetzt, mit 1,52 g konz. Schwefelsäure angesäuert und mit 75 g Preßhefe bei 18° zur Gärung angestellt.

Die Säurebestimmung in der Maische vor der Gärung ergab 0,11° Säure entspr. 0,495 g Milchsäure im Liter. $p_H = 6{,}4$.

Gelüftet wurde, um ein Ueberschäumen der Maische zu verhüten, anfangs mit 1,25 Liter in der Minute und nach Beendigung der stürmischen Hauptgärung, nach 23,5 Stunden, mit 5,5 Liter in der Minute. Nach 121 Stunden wurde die Lüftung abgestellt, und die Maische wurde abdestilliert. Die Maische ist also mit 31,995 cbm Luft gelüftet worden.

Die Säurebestimmung in der vergorenen Maische ergab 0,39° Säure entspr. 1,76 g Milchsäure im Liter. $p_H = 6{,}0$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Normale, große Zellen, wenige granulierte. Sehr wenig Stäbchen. 23,9% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 70 ccm = 55,23 g reiner Alkohol entspr. 15,1% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,84 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: 40 ccm 94,1 Vol.%iger Rohspiritus = 37,64 ccm reiner Alkohol ergaben 3 ccm fuselölhaltigen Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}06°$ (l=0,5).

Weitere Gärversuche mit Lüftung wurden angestellt mit Stickstoffzusätzen von 2,5; 0,5 und 0,05% N in Form von Ammoniumsulfat.

Versuch 26: 3,5 Liter Melassemaische vorstehender Zusammensetzung mit einem Zusatz von 94,08 g Ammoniumsulfat = 2,5% N wurde bei 20° zur Gärung angestellt.

Säure vor der Gärung: 0,31° entspr. 1,395 g Milchsäure im Liter. p_H = 5,4.

Gelüftet wurde zunächst mit 1 Liter in der Minute und nach 47,5 Stunden, als die Gefahr des Ueberschäumens nicht mehr bestand, mit 5,5 Ltr. in der Minute. Nach 162,75 Stunden wurde die Lüftung abgestellt, und die Maische wurde abdestilliert. Die Maische ist also mit 38,648 cbm Luft gelüftet worden.

Säure in der vergorenen Maische: 0,96° entspr. 4,32 g Milchsäure im Liter. p_H = 5,2.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen gut erhalten, wenig granulierte. 32,7% tote Zellen. Es war ein erheblicher Zuwachs an Hefe, die sich am Boden der Gärflasche abgesetzt hatte, zu beobachten.

Alkoholausbeute: 68 ccm = 53,65 g reiner Alkohol entspr. 14,6% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,31 Vol.%.

Die Untersuchung des Fuselöls ließ sich bei der geringen Menge Spiritus und dem geringen Fuselölgehalt nicht durchführen.

Versuch 27: 1595 g Melasse, 6 g Superphosphat, 37,63 g Ammoniumsulfat = 0,5% N, 3,03 g konz. Schwefelsäure wurden in einer 20 Ltr.-Flasche mit Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt und mit 150 g Preßhefe bei 20° zur Gärung angestellt, Säure vor der Gärung: 0,31 entspr. 1,395 g Milchsäure im Liter. p_H = 5,4.

Gelüftet wurde mit 1,5 Ltr. in der Minute, nach 24 Stunden mit 5 Ltr. in der Minute und nach 28,5 Stunden mit 7,2 Ltr. Nach 76 Stunden wurde die Lüftung abgestellt und die Maische abdestilliert. Die Maische ist also mit 24,03 cbm Luft gelüftet worden.

Säure in der vergorenen Maische: 1,07° entspr. 4,82 g Milchsäure im Liter. p_H = 5,15.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen normal, wenig granuliert. 38% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 200 ccm = 157,8 g reiner Alkohol entspr. 21,5% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,64 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 158 ccm 94 Vol.%igem Rohspiritus = 148,5 ccm reinem Alkohol 9,3 ccm fuselölhaltiger Rückstand von der Drehung α_D = — 0,21°. (l=2.)

Versuch 28: 7 Liter Melassemaische obiger Zusammensetzung mit einem Zusatz von 3,76 g Ammoniumsulfat = 0,05% N wurden bei 21° zur Gärung angestellt.

Säure vor der Gärung: 0,13° entspr. 0,585 g Milchsäure im Liter. p_H = 5,6.

Gelüftet wurde zunächst mit 2 Ltr. in der Minute und nach 32 Stunden mit 7 Ltr. Nach 96,5 Stunden wurde die Lüftung abgestellt und die Maische abdestilliert. Es ist also mit 30,5 cbm Luft gelüftet worden.

Säure nach der Gärung: 0,59° entspr. 2,46 g Milchsäure im Liter. PH = 5,4.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Normale Zellen, wenig granuliert, verschiedene ohne Vakuole. Einige Bakterien. 10,3% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 205 ccm = 161,75 g reiner Alkohol entspr. 22,1% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,78 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 178,5 ccm 94 Vol.%igem Rohspiritus = 167,8 ccm reinem Alkohol 12 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}24°$ (l=2).

Zur Feststellung des Zuwachses an Hefe wurde die vergorene Maische mit der am Boden abgesetzten Hefe gründlich durchgeschüttelt, so daß die Hefe in der gesamten Maische gleichmäßig verteilt war. Dann wurden 40 ccm abgenommen und durch ein Jenaer Glasfilter filtriert. Die Hefe wurde im Glasfilter zunächst mit Wasser gewaschen und dann bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dabei ergaben sich:

Hefetrockensubstanz in 40 ccm Maische = 0,4324 g, mithin sind Hefetrockensubstanz in 7 Ltr. Maische = 75,67 g.

Von der Aussaathefe hatten 1,4500 g bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet 0,3542 g bezw. 24,43% Trockensubstanzgehalt.

Die Hefeernte aus 7 Ltr. Maische betrug	75,67 g	Trockensubstanz
„ Hefeaussaat in 7 „ „ „	36,65 g	„
also betrug der Hefezuwachs	= 39,02 g = 106,46%	

Zum Vergleich waren 250 ccm einer analog zusammengesetzten Maische mit 5,3 g Preßhefe ohne Lüftung vergoren worden. Nach beendeter Gärung wurden 100 ccm dieser Maische nach gründlichem Durchschütteln durch ein Jenaer Glasfilter filtriert und die Hefe gewaschen und dann bei 105° getrocknet, wobei 0,5480 g Hefetrockensubstanz in 100 ccm Maische festgestellt wurden. Demnach war

Hefetrockensubstanz . .	in 250 ccm Maische	= 1,3700 g
„	der Aussaat in 250 ccm Maische	= 1,2948 g
also betrug der Hefezuwachs	= 0,0752 g = 5,8%	

Da diese Versuche zeigten, daß bei der Gärung mit Lüftung die Fuselölbildung derselben Gesetzmäßigkeit unterlag wie bei den entsprechenden Gärversuchen ohne Lüftung und nur die absolute Menge des Fuselöls geringer war, wurde festgestellt, in welcher Weise organischer Malzkeimstickstoff bei der Gärung mit Lüftung die Fuselölbildung beeinflußt.

Versuch 29: 1595 g Melasse, 6 g Superphosphat, 6,09 Liter Malzkeimauszug mit 0,633 g N = 0,666% N, 3,03 g konz. Schwefelsäure ergaben 7 Liter Maische und wurden bei 20° mit 150 g Preßhefe zur Gärung angestellt.

Säure vor der Gärung: 0,18° Säure entspr. 0,81 g Milchsäure im Liter. pH = 5,4.

Gelüftet wurde mit 1,75 Ltr. in der Minute und nach 23 Stunden mit 5,8 Ltr. Nach 93,5 Stunden wurde die Lüftung abgestellt und die Maische abdestilliert. Es ist also mit 26,949 cbm Luft gelüftet worden.

Säure in der vergorenen Maische: 0,98° entspr. 4,005 g Milchsäure im Liter. pH = 5,2.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Normale, wenig granulierte Zellen. Einige Stäbchen. 25% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 190 ccm = 149,91 g reiner Alkohol entspr. 20,5% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,62 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 162 ccm 94 Vol%igem Spiritus = 152,28ccm reinem Alkohol 7,2 ccm Rückstand. $\alpha_D = -0{,}28°$. (l=2.)

Nach Art der „Versuche über den Ersatz der Malzkeime in der Lufthefefabrikation durch Ammoniakverbindungen" von Wohl und Scherdel[17]) wurden dann noch Gärversuche mit gemischten Stickstoffzusätzen und Lüftung angestellt.

Versuch 30:

1595 g Melasse
3,045 Liter Malzkeimauszug = 0,333% N
25,042 g Ammoniumsulfat = 0,333% N
0,666% N
6 g Superphosphat
3,03 g konz. Schwefelsäure

} wurden mit Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt und mit 150 g Preßhefe

bei 24° zur Gärung angestellt.

Säure vor der Gärung: 0,2° entspr. 0,9 g Milchsäure im Liter. pH = 5,4.

Gelüftet wurde zunächst mit 1,5 Ltr. in der Minute und nach 13,5 Stunden mit 7,3 Ltr. Nach 94 Stunden wurde die Lüftung abgestellt, und die Maische wurde abdestilliert. Sie ist also mit 36,474 cbm Luft gelüftet worden.

Säure nach der Gärung: 0,99° entspr. 4,46 g Milchsäure im Liter. pH = 5,2.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen wenig granuliert, zum großen Teile mit Vakuole. Vereinzelt Bakterien und Oidiumfäden. 33% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 114 ccm = 89,95 g reiner Alkohol entspr. 12,3% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,71 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 80 ccm 94,1 Vol%igem Rohspiritus = 75,28 ccm reinem Alkohol 6 ccm Rückstand. $\alpha_D = -0{,}09°$ (l=1.)

Versuch 31:

1595 g Melasse
1,522 Liter Malzkeimauszug = 0,1665 % N
37,563 g Ammoniumsulfat = 0,4995 % N
0,666 % N
6 g Superphosphat
3,03 g konz. Schwefelsäure

wurden mit Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt und mit 150 g Preßhefe

bei 25° zur Gärung angestellt.

Säure vor der Gärung: 0,18° entspr. 0,81 g Milchsäure im Liter. pH = 5,4.

Gelüftet wurde anfangs mit 1,5 Ltr. in der Minute und nach 14,5 Stunden mit 7,25 Ltr. Nach 87 Stunden wurde die Lüftung abgestellt, und die Maische wurde abdestilliert. Sie ist also mit 32,845 cbm Luft gelüftet worden.

Säure nach der Gärung: 1,14° entspr. 5,13 g Milchsäure im Liter. pH = 5,2.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen vereinzelt granuliert. Einige Stäbchen. 38,7 % tote Zellen.

Alkoholausbeute: 152 ccm = 119,93 g reiner Alkohol entspr. 16,4% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,64 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 123 ccm 94 Vol%igem Rohspiritus = 115,62 ccm reinem Alkohol 6,2 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}12°$. (l=1.)

Versuch 32:

1595 g Melasse
4,566 Liter Malzkeimauszug = 0,4995 % N
12,521 g Ammoniumsulfat = 0,1665 % N
0,666 % N
6 g Superphosphat
3,03 g konz. Schwefelsäure

wurden mit Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt und mit 150 g Preßhefe

bei 23° zur Gärung angestellt.

Säure vor der Gärung: 0,18° entspr. 0,81 g Milchsäure im Liter. pH = 5,4.

Gelüftet wurde zunächst mit 1,5 Ltr. in der Minute und nach 13 Stunden mit 7,5 Ltr. in der Minute. Nach 85 Stunden wurde die Lüftung abgestellt, und die Maische wurde abdestilliert. Sie ist also mit 32,706 cbm Luft gelüftet worden.

Säure nach der Gärung: 0,97° entspr. 4,365 g Milchsäure im Liter. pH = 5,2.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Normale, wenig granulierte Zellen, vielfach mit Vakuole. Einige Bakterienfäden. 35% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 160 ccm = 126,24 g reiner Alkohol entspr. 17,2% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,67 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 131 ccm 94,1Vol%igem Rohspiritus = 123,27 ccm reinem Alkohol 6,7 ccm fuselölhaltiger Rückstand. $\alpha_D = -0{,}12^0$ (l=1).

Die Ergebnisse dieser Gärversuche sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6.

Gärversuche mit Melasse unter Zusatz von Ammoniumsulfat und Malzkeimauszug und bei gleichzeitiger Lüftung.

Zusammensetzung der Maischen: 1595 g Melasse, 6 g 17%iges Superphosphat mit Malzkeimauszug bezw. Wasser zu 7 Litern aufgefüllt und mit 3,03 g Schwefelsäure angesäuert.

Gärversuch Nr.	% zugesetzter Stickstoff in Form von		Gelüftet mit cbm Luft	Spiritusausbeuten			Fuselöl		Bei der Destillation verbliebener fuselölhaltiger Rückstand und dessen Drehung; l — 1	Fuselöl in dies. Rückstand		
				rein. Alkohol								
	Ammoniumsulfat.	Malzkeimauszug		ccm	g	Gew. % vom eingemaischten Zucker	Vol. % in 100%ig. Alkohol	absolute Menge ccm		ccm	Drehung α_D; l — 1	% Gehalt an d-Amylalkohol
25	0	0	32	70 aus 3,5 Ltr. Maische	55,23	15,1	0,84	0,59	aus 37,64 ccm reinem Alkohol $\alpha_D^{3\text{ ccm}} = -0,12^0$	0,3	— 1,21 °	25,2
28	0,05	0	30,5	205	161,75	22,1	0,78	1,60	aus 167,8 ccm r. A. $\alpha_D^{12\text{ ccm}} = -0,12^0$	1,3	— 1,12 °	23,2
27	0,5	0	24	200	157,80	21,5	0,64	1,28	aus 148,5 ccm r. A. $\alpha_D^{9,3\text{ ccm}} = -0,10^0$	0,9	— 1,03 °	21,4
26	2,5	0	38,6	68 aus 3,5 Ltr. Maische	53,65	14,6	0,31	0,21	Bei der geringen Menge Spiritus und dem geringen Fuselölgehalt war die Untersuchung des Fuselöles nicht durchführbar			
29	0	0,666	27	190	149,91	20,5	0,62	1,18	aus 152,3 ccm r. A. $\alpha_D^{7,2\text{ ccm}} = -0,14^0$	0,9	— 1,06 °	22,1
30	0,333	0,333	36,5	114	89,95	12,3	0,71	0,81	aus 75,28 ccm r. A. $\alpha_D^{6\text{ ccm}} = -0,09^0$	0,5	— 1,04 °	21,6
31	0,4995	0,1665	32,8	152	119,93	16,4	0,64	0,97	aus 115,6 ccm r. A. $\alpha_D^{6,2\text{ ccm}} = -0,12^0$	0,7	— 1,08 °	22,4
32	0,1665	0,4995	32,7	160	126,24	17,2	0,67	1,07	aus 123,3 ccm r. A. $\alpha_D^{6,7\text{ ccm}} = -0,12^0$	0,8	— 1,02 °	21,2

IV. Gärversuche mit Melasse unter Zusatz von autolysierter Bierhefe und mittels verschiedener Heferassen. Untersuchung von Bier auf Fuselölgehalt.

Bei den früheren Versuchen hatte es sich gezeigt, daß trotz Zusatz großer Stickstoffmengen zu den Melassemaischen sich bei der Gärung nicht unbeträchtliche Quantitäten Fuselöl gebildet hatten, die nach Art ihrer Zusammensetzung, besonders soweit die geringe Drehung des Fuselöls in Betracht kam, nur aus Aminosäuren des Hefeneiweißes selbst sich gebildet haben konnten. In den Hefezellen ist stets neben anderen Enzymen ein Eiweiß abbauendes Ferment vorhanden, das nach Art einer Autolyse imstande ist, das Hefenprotein bis zu den letzten Eiweißbausteinen, den Aminosäuren, zu spalten. Seine Wirkung ist eine sehr verschiedenartige je nach den Lebensbedingungen, unter denen sich die Hefe befindet. Sind die Vegetationsverhältnisse für die Hefe sehr ungünstig, etwa bei Abwesenheit lebenswichtiger Nährstoffe oder bei höheren Temperaturen, so kann unter Umständen durch die im Zellinneren wirkende Endotrypase ein vollständiger Abbau des Eiweißes zu Aminosäuren, das heißt also eine totale Autolyse bewirkt werden.

Da unter den abgespaltenen Aminosäuren stets auch die beiden Leucine in nicht unbeträchtlichen Mengen vorhanden sind, und diese neben anderen Aminosäuren wieder von derselben Hefezelle oder von anderen neu wachsenden Hefezellen zum Eiweißaufbau verwertet werden können, wobei regelmäßig Abbau zu Amylalkoholen erfolgt, so erklärt sich hiermit ohne weiteres, daß auch bei Vergärung von reinem Zucker mit reiner Hefe stets Fuselöl auftreten muß. Es ist aber auch verständlich, warum bei ungünstiger Stickstoffernährung und bei Zusatz von großen Mengen Substanzen, welche die Hefenvegetation ungünstig beeinflussen, wie etwa Ammoniumsulfat, infolge autolytischer Vorgänge stets Fuselöl in wechselnden Mengen zu beobachten ist.

Die Autolyse der Hefe vollzieht sich nun am schnellsten und vollständigsten, wenn man sie längere Zeit auf Temperaturen von 50—60° C. erhitzt, wobei schon nach einigen Stunden Verflüssigung der Hefe eintritt, und je nach der Zeitdauer eine mehr oder minderweit gehende Hydrolyse des Eiweißes zu Aminosäuren erfolgt. Solche Autolysengemische werden schon seit langer Zeit in der Praxis wegen ihres Gehalts an leicht assimilierbaren Stickstoffverbindungen und wohl auch wegen ihres Gehalts an Vitaminen zur Aufzucht gär- und triebkräftiger Hefen verwendet.

Wir wissen nun aus den Untersuchungen Emil Fischers und seiner Mitarbeiter[30]), daß die Abspaltung von Aminosäuren aus Eiweiß durch verdauende Enzyme successive erfolgen kann, wie das z. B. für die vor anderen Aminosäuren erfolgende Ablösung des Tyrosins aus dem Eiweißkomplex durch tryptische Fermente beobachtet worden ist. Es schien nun die Möglichkeit gegeben, daß sich bei der Hefenautolyse auch die Leucine eher aus dem Eiweißmolekül abspalten als andere Aminosäuren. War dieses wirklich der Fall, so mußte bis zu diesem Grad autolysierte Hefe die Leucine in verhältnismäßig reinem Zustand, noch wenig vermischt mit anderen Aminosäuren aufweisen, und es schien nicht unwahrscheinlich, daß man bei Zusatz solcher Gemische zu gärender Melasse höhere Fuselölausbeuten erzielen konnte.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden Melassemaischen der früher angegebenen Zusammensetzung mit einer Stickstoffnahrung versetzt, die nur aus autolysierter untergäriger Bierhefe bestand. Die Bierhefe war frisch aus einer Brauerei bezogen. Sie wurde im Wasserbad auf 50 bis 55° C. erhitzt, und es wurden nach 12, 24, 72 Stunden und 7 Tagen Autolysengemische entnommen. In einem Falle wurde ferner die Hefe fünf Wochen verschlossen bei Temperaturen zwischen -10^0 und $+10^0$ C. aufbewahrt, wobei sie sich verflüssigt hatte. Diese verschieden lange autolysierten Hefengemische wurden dann den zur Gärung angestellten Melassemaischen zugesetzt.

Besonders bemerkenswert war bei diesen Gärversuchen mit Hefenautolysat eine durchweg beobachtete absolut schaumfreie Gärung. Diese ist vermutlich auf das bei der Autolyse aus den Zellen ausgetretene Hefefett zurückzuführen. Der Fettgehalt der Hefen schwankt zwischen 2 bis 5% der Trockensubstanz, doch können alte Hefen besonders bisweilen einen erheblich höheren Fettgehalt aufweisen.

Bei Untersuchung der vollständig vergorenen Maischen zeigte sich, daß bei allen Versuchen hinsichtlich der Fuselölbildung geringe Schwankungen zu beobachten waren gegenüber dem Versuch der Vergärung reiner Melasse für sich (Tabelle 7). Bei Zusatz des 12-Stundenautolysats war eine kleine Abnahme von Fuselöl, bei Zusatz des 24-Stundenautolysats eine kleine Zunahme gegenüber der reinen Melassegärung zu beobachten. Durch die Aminosäurengemische der weiter durchgeführten Autolyse war dagegen nur eine Herabminderung der Fuselölmenge eingetreten. Wenn also vielleicht auch im ersten Stadium der Autolyse eine Mehrproduktion von Leucinen wahrscheinlich ist, so lassen die Ergebnisse doch darauf schließen, daß zugleich mit den Leucinen auch soviel andere Aminosäuren durch

[30]) Fischer und Abderhalden: Zeitschr. f. phys. Chem. 39, 81 (1903); 40, 215 (1903).
Fischer und Bergell: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 36, 2593 (1903).

das autolylische Ferment aus dem Hefeneiweiß abgespalten werden, daß die Hefe infolge der sonst noch vorhandenen Stickstoffquellen ihren Stickstoffbedarf nur zum Teil aus den Leucinen deckt, diese also entsprechend weniger angreift. Auch die Drehung des isolierten Fuselöls und sein Gehalt an d-Amylalkohol, der bei allen Autolysatzusätzen konstant etwa 19 bis 20% beträgt, während er bei reiner Melassegärung 29% zeigte, deutet darauf hin, daß die Leucine in allen diesen Fällen mit annähernd konstanten Mengen anderer Aminosäuren zusammen abgespalten waren. Aus diesem Grunde kann es also auch bei Zusätzen solcher leucinhaltiger Autolysate nicht zur Bildung größerer Fuselölmengen bei der Gärung kommen.

Bemerkenswert erscheint noch, daß bei diesen Versuchen die Alkoholausbeute, auf Zucker berechnet, um so mehr abnahm, je weitergehend in der zugesetzten Stickstoffnahrung die Hefe autolysiert worden war. Diese Erscheinung ist offenbar so zu erklären, daß je länger die Autolyse der zugesetzten Nährhefe dauerte, die wachsenden Hefezellen in den Gärversuchen um so mehr leicht assimilierbare Stickstoffverbindungen (Aminosäuren) vorfinden und daher um so intensiver neues Eiweiß produzieren können. Entsprechend ihrer stärkeren Eiweißassimilation wird dann auch mehr Zucker für den Eiweißaufbau von den Zellen aufgebraucht, was zur Folge hat, daß die Alkoholausbeuten in demselben Grade sich vermindern.

Schließlich wurde noch untersucht, wie sich die Fuselölbildung anderer Heferassen bei Vergärung von Melasse gestaltet. Es wurde dabei von größeren Mengen fertig gebildeter Preßhefe ausgegangen, die in einer Brauerei aus Reinkulturen von Saccharomyces ellipsoideus II und einer untergärigen Bierhefe erhalten waren. In beiden Fällen wurde ein Spiritus mit geringerem Fuselölgehalt als bei der obergärigen Brennereihefe erzielt. Mit Saccharomyces ellipsoideus II wurde bei Vergärung gleicher Melassemengen nur etwa drei Viertel, mit untergäriger Bierhefe nur etwa die Hälfte der absoluten Menge Fuselöl wie mit obergäriger Brennereihefe gewonnen. Die untergärige Brauereihefe ergab ein etwas höher drehendes Fuselöl.

Da auch untergärige Brauereihefe, wie aus Versuch 40 ersichtlich, Fuselöl produziert, so war anzunehmen, daß das mit ihrer Hilfe gebraute Bier Amylalkohol enthalten mußte. Ueber den Fuselölgehalt der Biere liegen so gut wie keine Angaben vor. Es schien daher interessant, das mit dieser Hefe in einer Großbrauerei hergestellte Bier auf seinen Fuseölgehalt zu untersuchen. Es zeigte sich, daß das frische Bier 3,89%Alkohol aufwies, und daß, auf absoluten Alkohol berechnet, 0,53 Vol.% Fuselöl darin enthalten waren. Demnach war also im Liter Bier 0,17 g Fuselöl enthalten.

1. Melassegärversuche mit Zusatz von autolysierter Bierhefe.

Zunächst wurde die zu diesen Gärversuchen verwendete Melasse der Zuckerfabrik Rosenthal aus der Campagne 1925 untersucht.

Die polarimetrische Zuckeruntersuchung ergab 50,8 % Zuckergehalt. Der scheinbare Trockensubstanzgehalt war 81° Brix bei 20°. Daraus ergibt sich der Reinheitsquotient zu 62,7. Die Melasse war alkalisch. 20 g verbrauchten bis zur sauren Reaktion gegen Lackmus 9,4 ccm n/10 Schwefelsäure.

N-Bestimmung nach Stoltzenberg[29]):

1. 2,8866 g Melasse verbrauchten 30,7 ccm n/10 Schwefelsäure,

2. 2,8258 g Melasse verbrauchten 28,9 ccm n/10 Schwefelsäure gefunden: 1. 1,49% N, 2. 1,43% N.

Um in den Maischen dieselbe Zuckerkonzentration wie in den vorhergehenden Gärversuchen zu haben, wurden von dieser Melasse zu den nachstehenden Versuchen nur 1444 g mit 733,5 g Zuckergehalt eingemaischt.

Zunächst wurde festgestellt, wie sich diese Melasse bei der Gärung ohne jeden Stickstoffzusatz verhält.

Versuch 33: 1444 g Melasse, 6 g 17%iges Superphosphat wurden mit Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt, mit 3,39 g konz. Schwefelsäure angesäuert und mit 150 g Preßhefe bei 20° in vier Tagen vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,12° entspr. 0,54 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}6$.

Untersuchung der Hefe nach 15 Stunden: Normale, saftreiche Zellen, teilweise mit Vakuolen. Plasma wenig gekörnt. 22% tote Zellen.

Säure nach der Gärung: 0,61° Säure entspr. 2,75 g Milchsäure im Liter. $p_H = 5{,}4$.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen fast durchweg eiförmig, etwas gekörnt, einzelne mit Vakuole. 42% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 439 ccm = 346,37 g reiner Alkohol entspr. 47,3% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 1,13 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 411 ccm 94,1 Vol%igem Rohspiritus = 386,75 ccm reinem Alkohol 13,4 ccm fuselölhaltiger Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}45°$ (l=1).

Es wurden nun einige Gärversuche mit Zusatz von verschieden lange der Selbstverdauung überlassener untergäriger Bierhefe der Breslauer Lagerbierbrauerei E. Haase G. m. b. H. ausgeführt.

Versuch 34: Melassemaische von der Zusammensetzung wie in Versuch 33 mit einem Zusatz von 325 g 12 Stunden lang im Wasserbad bei 50 bis 55° C. autolysierter Bierhefe wurde bei 20° in fünf Tagen vergoren. Die Gärung verlief vollständig schaumfrei.

Säure vor der Gärung: 0,47° entspr. 2,12 g Milchsäure im Liter. pH = 5,4.

Untersuchung der Hefe nach 20 Stunden: Zellen nur zum Teil gut erhalten. Dazwischen viele Zellen mit abgelöster oder geschrumpfter Membran. Da es sich hierbei höchstwahrscheinlich um die zugesetzte autolysierte Hefe handelt, wurden die lebenden und toten Zellen nicht gezählt.

Säure nach der Gärung: 0,53° entspr. 2,39 g Milchsäure im Liter. pH = 5,2.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Rundliche und ovale Zellen, alle gekörnt, zum Teil mit abgelöster Membran. Einige Stäbchen. Etwas Niederschlag oder Zellinhalt zerstörter Zellen.

Alkoholausbeute: 433 ccm = 341,64 g reiner Alkohol entspr. 46,6% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,96 Vol%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 407 ccm 94,1 Vol.%igem Rohspiritus = 382,99 ccm reinem Alkohol 13,3 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}26°$ (l=1).

Versuch 35: Melassemaische mit einem Zusatz von 325 g 24 Stunden lang bei 50 bis 55° autolysierter Bierhefe wurde bei 20° in vier Tagen schaumfrei vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,13° entspr. 0,59 g Milchsäure im Liter. pH = 6,2.

Säure nach der Gärung: 0,33° entspr. 1,49 g Milchsäure im Liter. pH = 6,0.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Normale Zellen, meistens etwas gekörnt und häufig mit deutlich sichtbarer Membran.

Alkoholausbeute: 438 ccm = 345,58 g reiner Alkohol entspr. 47,1% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 1,17 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 404 ccm 94,2 Vol.%igem Spiritus = 380,57 ccm reinem Alkohol 13,9 ccm fuselölhaltiger Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}31°$ (l=1).

Versuch 36: Melassemaische mit einem Zusatz von 325 g 72 Stunden lang bei 50 bis 55° autolysierter Bierhefe wurde bei 20° in drei Tagen schaumfrei vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,15° entspr. 0,68 g Milchsäure im Liter. pH = 6,2.

Säure nach der Gärung: 0,34° entspr. 1,53 g Milchsäure im Liter. pH = 6,0.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen meistens granuliert. Ungefähr ein Drittel normale mit Vakuole und hellem Plasma.

Alkoholausbeute: 425 ccm = 335,33 g reiner Alkohol entspr. 45,7% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,93 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 390 ccm 94,2 Vol.%igem Rohspiritus = 367,38 ccm reinem Alkohol 11,9 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}28^0$ (l=1).

Versuch 37: Melassemaische mit einem Zusatz von 325 g 7 Tage lang im Wasserbad bei 50 bis 55° autolysierter Bierhefe wurde bei 20° in drei Tagen vollständig schaumfrei vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,1° entspr. 0,45 g Milchsäure im Liter. pH = 6,6.

Säure nach der Gärung: 0,26° entspr. 1,17 g Milchsäure im Liter. pH = 6,4.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Zellen normal, wenig gekörnt, vielfach mit Vakuole. Dazwischen granulierte Zellen mit abgelöster Membran.

Alkoholausbeute: 416 ccm = 328,22 g reiner Alkohol entspr. 44,8% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,80 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 390 ccm 94 Vol.%igem Rohspiritus = 366,6 ccm reinem Alkohol 9,9 ccm Rückstand von der Drehung $\alpha_D = -0{,}26^0$ (l=1).

Versuch 38: Melassemaische mit einem Zusatz von 325 g Bierhefe, die sich durch fünfwöchiges Stehen auf dem Balkon in einer geschlossenen Blechbüchse bei Temperaturen, die zwischen — 10° und + 10° C. schwankten, autolytisch zersetzt hatte, wurde bei 20° in drei Tagen schaumfrei vergoren. Säure vor der Gärung: 0,07° entspr. 0,32 g Milchsäure im Liter. pH = 6,0.

Säure nach der Gärung: 0,33° entspr. 1,49 g Milchsäure im Liter. pH = 5,8.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Normale, ovale Zellen, nur zum Teil mit Vakuolen und mit gekörntem Plasma. Dazwischen Zellen mit abgelöster Membran.

Alkoholausbeute: 407 ccm = 321,12 g reiner Alkohol entspr. 43,8% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,95 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 380 ccm 94 Vol.%igem Spiritus = 357,2 ccm reinem Alkohol 10,4 ccm Rückstand. $\alpha_D = -0{,}29^0$ (l=1).

Nachdem bei den Gärversuchen mit autolysierter Bierhefe keine stärkere Fuselölbildung zu erreichen war, wurden noch zwei von der Breslauer Lagerbierbrauerei E. Haase bezogene Hefen hinsichtlich ihres Fuselölbildungsvermögens bei der Melassegärung untersucht.

Versuch 39: Melassemaische von der Zusammensetzung wie in Versuch 33 wurde mit 150 g gepreßter Staubhefe Saccharomyces ellipsoideus II bei 22° in vier Tagen vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,13° entspr. 0,59 g Milchsäure im Liter. pH = 6,0.

Untersuchung der Hefe nach 20 Stunden: Normale, runde und ovale Zellen, bisweilen mit gekörntem Plasma. 24% tote Zellen.

Säure nach der Gärung: 0,27° entspr. 1,22 g Milchsäure im Liter. PH = 5,8.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Fast durchweg verhältnismäßig kleine, ovale Zellen, einige mit gekörntem Plasma und verschiedene geschrumpft. 39% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 437 ccm = 344,79 g reiner Alkohol entspr. 47,0% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,84 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 403 ccm 94 Vol.%igem Rohspiritus = 378,8 ccm reinem Alkohol 12,3 ccm fuselölhaltiger Rückstand. $\alpha_D = -0{,}26^0$ (l=1).

Versuch 40: Melassemaische vorstehender Zusammensetzung wurde mit 150 g gepreßter untergäriger Bierhefe bei 20° in drei Tagen vergoren.

Säure vor der Gärung: 0,15° entspr. 0,68 g Milchsäure im Liter. PH = 6,2.

Untersuchung der Hefe nach 15 Stunden: Ovale Zellen, sehr gleichmäßig in der Form, Größe wechselnd. Zellen gut erhalten. Wenig gekörntes Plasma. 34,5% tote Zellen.

Säure nach der Gärung: 0,29° entspr. 1,31 g Milchsäure im Liter. PH = 6,0.

Untersuchung der Hefe nach der Gärung: Ovale und runde Zellen, meistens granuliert. 56,5% tote Zellen.

Alkoholausbeute: 426 ccm = 336,11 g reiner Alkohol entspr. 45,8% vom eingemaischten Zucker. Fuselölgehalt: 0,59 Vol.%.

Untersuchung des Fuselöls: aus 388 ccm 94,1 Vol.%igem Rohspiritus = 365,11 ccm reinem Alkohol 11,9 ccm fuselölhaltiger Rückstand. $\alpha_D = -0{,}21^0$ (l=1).

Die Ergebnisse dieser Gärversuche sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7. **Gärversuche mit Melasse unter Zusatz von mehr oder minder weitgehend autolysierter Bierhefe und mittels verschiedener Heferassen.**

Zusammensetzung der Maischen: 1444 g Melasse, 6 g 17%iges Superphosphat mit Leitungswasser zu 7 Litern aufgefüllt und mit 3,39 g konzentrierter Schwefelsäure angesäuert.

Gärversuch Nr.	Vergoren mit	Zusatz von autolysierter Bierhefe	Spiritusausbeuten: rein. Alkohol ccm	Spiritusausbeuten: rein. Alkohol g	Spiritusausbeuten: Gew.-% vom eingemaischten Zucker	Fuselöl: Vol.-% in 100%ig. Alkohol	Fuselöl: absolute Menge ccm	Bei der Destillation verbliebener fuselölhaltiger Rückstand und dessen Drehung; l = 1	Fuselöl in dies. Rückstand: ccm	Fuselöl in dies. Rückstand: Drehung α_D; l = 1	Fuselöl in dies. Rückstand: % Gehalt an d-Amylalkohol
33	obergäriger Brennereihefe	—	439	346,37	47,3	1,13	4,96	aus 386,75 ccm reinem Alkohol $\alpha_D^{13,4\text{ ccm}}$ −0,45°	4,3	— 1,40°	29,0
34	dto	325 g 12 Std. bei 50° C autolysiert	433	341,64	46,6	0,96	4,31	aus 382,99 ccm r. A. $\alpha_D^{13,3\text{ ccm}}$ −0,26°	3,6	— 0,96°	20,0
35	dto.	325 g 24 Std. bei 50° C autolysiert	438	345,58	47,1	1,17	5,12	aus 380,57 ccm r. A. $\alpha_D^{13,9\text{ ccm}}$ −0,31°	4,4	— 0,97°	20,1
36	dto.	325 g 72 Std. bei 50° C autolysiert	425	335,33	45,7	0,93	3,95	aus 367,38 ccm r. A. $\alpha_D^{11,9\text{ ccm}}$ −0,28°	3,4	— 0,97°	20,1
37	dto.	325 g 7 Tage bei 50° C autolysiert	416	328,22	44,8	0,80	3,33	aus 366,6 ccm r. A. $\alpha_D^{9,9\text{ ccm}}$ −0,26°	2,9	— 0,88°	18,4
38	dto.	325 g 5Woch. b.-10bis +10° autolysiert	407	321,12	43,8	0,95	3,87	aus 357,2 ccm r. A. $\alpha_D^{10,4\text{ ccm}}$ −0,29°	3,3	— 0,94°	19,6
39	Saccharomyces ellipsoideus II	—	437	344,79	47,0	0,84	3,67	aus 378,8 ccm r. A. $\alpha_D^{12,3\text{ ccm}}$ −0,26°	3,1	— 1,04°	21,6
40	untergäriger Brauereihefe	—	426	336,11	45,8	0,59	2,51	aus 365,11 ccm r. A. $\alpha_D^{11,9\text{ ccm}}$ −0,21°	2,1	— 1,23°	25,5

2. Untersuchung von Bier auf Fuselölgehalt.

Da die Ester der höheren Alkohole einen wesentlichen Einfluß auf Geschmack und Aroma sämtlicher alkoholischen Getränke haben, war es von Interesse, den Fuselölgehalt eines schlesischen Lagerbieres festzustellen. In der Literatur liegen nur wenig Angaben [31]) über das Fuselöl bezw. Art und Menge seiner Ester im Bier vor. Das Breslauer Lagerbier „Haase Gold" wurde deshalb auf seinen Fuselölgehalt untersucht. Die Analyse dieses Bieres ergab folgendes:

Es = scheinbarer Extrakt = 2,6%.
Ew = wirklicher Extrakt = 4,37%.
A = Alkohol = (Ew—Es). 2,2 = 3,89%.
E = Stammwürze = (Ew—Es). 4,3 + Ew = 11,98%.

12 Liter dieses Bieres wurden zur Verhütung des starken Schäumens mit einer Messerspitze Tannin versetzt und mittels Birektifikators destilliert. Das Destillat wurde zur Verseifung der Ester mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und nochmals destilliert. Nach zwei weiteren Destillationen ohne jeden Zusatz wurden 755 ccm 61,6 Vol.%iger Alkohol = 465,08 ccm reiner Alkohol erhalten. Die Fuselölbestimmung in diesem Spiritus ergab 0,53 Vol.% Fuselöl, bezogen auf absoluten Alkohol. Das sind auf das Bier mit 3,89% Alkoholgehalt umgerechnet 0,02 Vol.% Fuselöl.

---

[31]) Windisch, Reimers u. Hirschbruch: Wochenschr. f. Brauerei 1915, Seite 1. — Mumme: Wochenschr. f. Brauerei 1924, Seite 137.

V. Gärversuche mit reinem Zucker unter Zusatz von Leucin zur Erzielung einer maximalen Ausbeute an Fuselöl im Rohspiritus.

Nach den Untersuchungen von F. Ehrlich [3]) kann man durch Zusatz von Leucinen und verwandten Aminosäuren zur gärenden Maischen den Fuselölgehalt des Rohspiritus erheblich steigern. Bei seinen Versuchen gelangte Ehrlich bis zu einer Maximalausbeute an Fuselöl von 2,98 Vol.% auf absoluten Alkohol gerechnet. Auch A. Hackbarth [32]) konnte im hiesigen Institut bei ausgedehnten Gärversuchen unter Zusatz von Leucin zu verschiedenen Maischen nur Rohspiritus mit einem Höchstgehalt von 2,89% Fuselöl gewinnen. Diese Resultate ließen sich immer nur erzielen, wenn möglichst reiner Zucker mit möglichst reinem Leucin unter Verwendung einer reinen Preßhefe vergoren wurde. Schon geringe stickstoffhaltige Verunreinigungen des Zuckers oder des Leucins drückten die Ausbeuten an Fuselöl deutlich herab.

Es schien nun in Hinsicht auf viele theoretische und praktische Fragen von Interesse zu untersuchen, ob durch geeignete Abänderungen der Versuchsanordnungen sich nicht noch günstigere Erfolge erhalten ließen, und die Ausbeuten an Fuselöl entsprechend zu steigern waren. H. Pringsheim [33]) gibt nämlich an, daß es ihm durch Ausnutzung bestimmter Zuckerkonzentration und geeigneter Mengenverhältnisse von Zucker und Leucin gelungen wäre, Fuselölausbeuten bis zu 7,06% im Rohspiritus zu erreichen. Er glaubt, daß im ersten Stadium der Gärung mehr Fuselöl von der Hefe gebildet wird, als späterhin und hat seine höheren Zahlen an Fuselöl scheinbar dadurch erreicht, daß er vorzeitig die Gärung abbrach und den bis dahin gebildeten fuselölhaltigen Alkohol abdestillierte und untersuchte. Er hatte bei seinen Versuchen in der Weise gearbeitet, daß er eine große Aussaat von Hefe, die Wachstum während der Gärung ausschloß, auf einen enormen Ueberschuß von Leucin neben wenig Zucker wirken ließ.

Trotz genauer Befolgung der Pringsheimschen Angaben, aber unter Anwendung weit beträchtlicherer Mengenverhältnisse, die möglichst jede Fehlerquelle ausschlossen, gelang es mir nicht, seine Angaben hinsichtlich der von ihm erreichten Maximalausbeute an Fuselöl im Alkohol zu bestätigen.

---

[32]) A. Hackbarth: Inaugural-Dissertation Breslau 1923.
[33]) H. Pringsheim: Biochem. Zeitschr. 3, 121 (1907).

Zunächst zeigte es sich, daß im Verlauf der Gärung der Fuselölgehalt des Spiritus ziemlich konstant bleibt und gegen Ende der Gärung nur unwesentlich abnimmt. Bei einem Gärversuch von 200 g Zucker und 10 g Leucin in 2 Litern Wasser ergab sich bei Vergärung mit 100 g Preßhefe ein Fuselölgehalt des Spiritus

nach 3 Stunden von 3,48%
nach 7 Stunden von 3,46%
nach 17 Stunden von 3,21%

und nach vollständiger Vergärung (3 Tage) von 2,84 Vol.%.

Daraus erscheint also in Uebereinstimmung mit früheren Angaben von F. Ehrlich die Folgerung berechtigt, daß zur Umwandlung einer bestimmten Menge Leucin in Amylalkohol stets die Vergärung einer bestimmten Zuckermenge erforderlich ist.

Besonders bemerkenswert war auch bei diesen Versuchen, bei denen die Leucinmenge 5% vom eingemaischten Zucker betrug, daß die erhaltene Höchstausbeute an Fuselöl im Alkohol von 3,48% nicht entfernt an die von Pringsheim gefundene Maximalzahl (7,06%) heranreichte. Um nun noch einen einwandfreien, entscheidenden Versuch anzustellen zur Feststellung, ob überhaupt eine über 3,4% hinausgehende Steigerung der Fuselölausbeute unter den allergünstigsten Bedingungen der Gärung möglich ist, wurde ein Gäransatz von 100 g Zucker und 30 g Leucin in 5 Litern Wasser mit 50 g ganz frischer, obergäriger Preßhefe vergoren. Selbst bei einer derartigen Ueberschwemmung der gärenden Maische mit Leucin, dessen Konzentration auf Zucker berechnet 30% ausmachte, war nach vollständiger Vergärung des Zuckers innerhalb von 2 Tagen ein Spiritus von nur 3,84 Vol.% Fuselöl aus der vergorenen Maische zu isolieren. Selbst unter diesen denkbar günstigsten Gärungsbedingungen für die Entstehung von Amylalkohol aus Leucin war eine Bestätigung der Pringsheimschen Maximalzahl nicht zu erzielen. Da Pringsheim nur angibt, daß er obergärige Preßhefe verwendet hat, ist nicht festzustellen, ob etwaige Verschiedenheit der angewandten Heferassen für die Differenz der Versuchsergebnisse verantwortlich zu machen ist. Jedenfalls kann der hier beschriebene Versuch eine größere Genauigkeit für sich beanspruchen, da er zwar unter genauer Einhaltung der Gewichts- und Volumenverhältnisse des Pringsheimschen Gärversuches, aber unter Verwendung der zwanzigfachen Menge der einzelnen Komponenten durchgeführt wurde.

Pringsheim vergor eine Lösung von 5 g Zucker und 1,5 g Leucin in 250 ccm Wasser. Bei diesem Gärversuch hätten sich im Maximum bei vollständiger Vergärung annähernd 2,5 g Alkohol bilden können. Da aber Pringsheim bei seinen Versuchen ausdrücklich angibt, daß er auf vollständige Vergärung des Zuckers keinen Wert gelegt hat, so ist in diesem entscheidenden Versuch vermutlich noch erheblich

weniger Alkohol gebildet worden. Bei derartigen Versuchen werden aber die Fehlerquellen um so größer, je geringer die absolute Menge des entstandenen Alkohols in der vergorenen Maische ist, und in diesem Fall entstandene Fehler werden sich bei Berechnung des Prozentgehalts an Fuselöl im Spiritus noch entsprechend vervielfachen.

Pringsheim hat die Bestimmung des Fuselöls nach dem Verfahren von Beckmann[34]) ausgeführt. Bei Anwendung dieser Methode können, wie das Pringsheim selbst zugibt, wesentliche Fehlerquellen entstehen, einmal bei der Trennung des Fuselöls vom Alkohol, dann nach der Oxydation des Fuselöls bei der Endtitration der in Freiheit gesetzten salpetrigen Säure durch das Permanganat und schließlich bei der Berechnung aller im Fuselöl enthaltenen Alkohole, die doch in ihrem Verhältnis zueinander in verschiedenen Fällen schwanken, auf Amylalkohol.

Alle diese Nachteile des Beckmannschen Verfahrens konnten bei der von mir angewandten Röse-Herzfeldschen Methode zur Bestimmung des Fuselöls vermieden werden, besonders auch dadurch, daß ganz beträchtlich größere Mengen von Rohspiritus zur Untersuchung kamen. Die Angabe Pringsheims, daß er „die bis jetzt höchste Amylalkoholkonzentration des Gärungsalkohols nach dem Ehrlichschen Verfahren mit 7% erreicht habe", konnte also durch die folgenden Untersuchungen in keiner Weise bestätigt werden, vielmehr läßt sich auf Grund der hier wiedergegebenen Resultate mit Sicherheit angeben, daß eine Anreicherung von Amylalkohol im Rohspiritus selbst bei Vergärung von reinstem Zucker und reinstem Leucin über 4% hinaus nicht zu erreichen ist.

In Hinsicht auf die praktische Ausnutzung der Leucinvergärung dürften aber alle diese Zahlen von geringem Belang sein, da es sich nach der gewonnenen Erkenntnis, daß das Fuselöl nicht aus dem Zucker stammt, gar nicht mehr um die Frage der Anreicherung des Fuselöls im Rohspiritus handeln kann, sondern die vollkommene Ausnutzung des der Hefe vorgelegten Leucins und seine vollständige Umsetzung zu Amylalkohol von viel größerer Bedeutung sein muß. In dem von mir beschriebenen Versuch mit der Maximalausbeute von Fuselöl im Spiritus von 3,84%, ließen sich aus der vergorenen Maische von 30 g angewandtem Leucin noch 20,4 unangegriffen wieder zurückgewinnen.

Schließlich wurde noch versucht, eine bessere Ausnutzung des Leucins bei derartigen Vergärungen dadurch zu erzielen, daß man den gärenden Zucker-Leucinlösungen Vitamine enthaltende Nährsubstrate wie z. B. Hefenautolysat zusetzte.

---

[34]) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel. 10, 143 (1905).

Nach Versuchen von F. Ehrlich[35]) kann man bei der Vergärung von Tyrosin den Umsatz dieser Aminosäure und die Ausbeute an Tyrosol (Paraoxyphenyläthylalkohol), das durch Gärung daraus entsteht, beträchtlich steigern, wenn man der Maische eine geringe Menge Hefenautolysat oder Malzkeimauszug zusetzt.

Es wurden deshalb noch Gärversuche angestellt, bei denen Zucker- und Zucker-Leucinlösungen für sich und nach Zusatz von Hefenautolysat vergoren wurden. In beiden Fällen zeigte sich aber kaum ein Unterschied in dem Ertrag an Fuselöl. In den Versuchen mit Zusatz von Hefenautolysat war sowohl gegenüber der leucinfreien, wie gegenüber der leucinhaltigen Maische eine geringe Verminderung der Fuselölbildung eingetreten. Offenbar waren neben den zugeführten Vitaminen mit dem Autolysat soviel andersartige Aminosäuren in die Maische gelangt, daß die Hefe diese vorzugsweise assimilierte und entsprechend weniger Leucin angriff, so daß entsprechend weniger Fuselöl entstanden war. Durch die gewählte Versuchsanordnung konnte also die Frage, ob durch Vitaminzufuhr eine Mehrproduktion an Fuselöl zu erreichen ist, vorläufig nicht definitiv entschieden werden. Es ist dabei auch noch zu bemerken, daß die hier mit großen Mengen frischer Hefe und Hefenautolysat angestellten Versuche insofern von denen F. Ehrlichs abweichen, als seine Versuche mit einer Aufzucht von viel Hefe aus wenig Zellen unter Zusatz von sehr geringen Mengen Vitaminsubstanz durchgeführt worden sind.

Gärversuche mit reinem Zucker und Leucin.

Das zu den nachstehenden Versuchen verwendete Leucin stammte aus Melasseschlempe. Es wurde aus Leucinkupfer in der Weise hergestellt, daß das Salz in Wasser suspendiert und in der Wärme Schwefelwasserstoff eingeleitet wurde. Dann wurde vom ausgeschiedenen Kupfersulfid mit Kieselgur abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbad eingeengt. Auf diese Weise wurde ein verhältnismäßig reines, nur schwach gelblich gefärbtes Produkt erhalten, das nach nochmaligem Umkristallisieren ganz rein und weiß aussah.

Um festzustellen, ob sich, wie Pringsheim angibt, der Fuselölgehalt im Spiritus bis auf 7% heraufdrücken läßt, wurden als

Versuch 41: 100 g ungeblaute Raffinade und 30 g Leucin unter Erwärmen in 5 Litern Leitungswasser gelöst und nach dem Abkühlen mit 50 g Preßhefe bei 20° C. zur Gärung angestellt.

---

[35]) F. Ehrlich: Biochem. Zeitschr. 182, 245 (1927).

Nach zwei Tagen fiel die Prüfung auf Zucker im Hefefiltrat mit Fehlingscher Lösung, wie auch mit α-Naphtol negativ aus. Die Drehung war $\alpha_D = +0{,}4^0$ Sacch. (l=2.)

Zur Entfernung der Hefe wurde die vergorene Maische durch eine Tonzelle gesaugt. Die zurückbleibende Hefe wurde mit Wasser gut nachgewaschen und die Maische zusammen mit dem Hefenwaschwasser mittels Birektifikators abdestilliert.

Aus der entgeisteten Maische wurde durch Eindampfen auf dem Wasserbad das nicht verbrauchte Leucin zurückgewonnen.

Dieses wurde zunächst mit Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 20,4 g.

Das alkoholische Destillat wurde zur weiteren Konzentration noch fünfmal destilliert. Dadurch wurden 120 ccm 41,4 Vol.%iger Spiritus = 49,68 ccm reiner Alkohol erhalten. Die Fuselölbestimmung in diesem Spiritus ergab 3,84 Vol.% Fuselöl, bezogen auf absoluten Alkohol.

Der von Pringsheim angegebene Wert wurde also nicht annähernd erreicht. Da seine Maische nicht vollständig vergoren war, wurden die Gärversuche 42, 43, 44 und 45 angestellt, um festzustellen, wie dieser Umstand die Fuselölbildung beeinflußt.

Die Zusammensetzung der Maischen war bei diesen Gärversuchen in jedem Fall: 200 g Raffinade, 10 g Leucin in 2 Litern Leitungswasser gelöst und mit 100 g Konstädter Preßhefe vergoren.

Versuch 42 wurde nach vollständiger Beendigung der Gärung (3 Tage) abdestilliert. Die Spiritusausbeute war 250 ccm 48 Vol.%iger Spiritus = 120 ccm reiner Alkohol. Fuselölgehalt 2,84%.

Versuch 43 wurde nach 17 Stunden abdestilliert. Die Drehung der Maische war $\alpha_D = +0{,}2^0$ Sacch. (l=2). Die α-Naphtolreaktion fiel schwach positiv aus. Die Spiritusausbeute war 260 ccm 35,2 Vol.%iger Spiritus = 91,5 ccm reiner Alkohol. Der Fuselölgehalt war 3,21%.

Versuch 44 wurde nach 7 Stunden abdestilliert. Die Drehung der Maische war $\alpha_D = -3{,}6^0$ Sacch. (l=2). Die α-Naphtolreaktion war stark positiv. Die Spiritusausbeute betrug 220 ccm 33,9 Vol.%iger Spiritus = 74,58 ccm reiner Alkohol. Der Fuselölgehalt war 3,46%.

Versuch 45 wurde nach 3 Stunden abdestilliert. Die Drehung der Maische war $\alpha_D = -3{,}9^0$ Sacch. (l=2). Die Spiritusausbeute betrug 125 ccm 31,6 Vol.%iger Spiritus = 39,5 ccm reiner Alkohol. Fuselölgehalt 3,485%.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß die mehr oder weniger vollständige Vergärung der Maischen den Fuselölgehalt des Spiritus nur minimal beeinflußt. Sie sind in der folgenden Tabelle übersichtlich zusammengestellt.

Fuselölgehalt des Alkohols bei unvollständiger Vergärung der Maischen.

Versuch Nr.	Zusammensetzung der Maischen	Dauer der Gärung	Spiritusausbeute in ccm reinem Alkohol	Fuselölgehalt bezogen auf 100%igen Alkohol
42	200 g Raffinade, 10 g Leucin. 2 Liter Leitungswasser, 100 g Preßhefe	3 Tage	120	2,84 %
43		17 Stund.	91,5	3,21 %
44		7 Stund.	74,58	3,46 %
45		3 Stund.	39,5	3,485 %

Um festzustellen, ob und wie Zusätze von Hefenautolysat die Fuselölbildung beeinflussen, wurden die folgenden Gärversuche angestellt:

Versuch 46: 100 g ungeblaute Raffinade wurden in 1 Liter Leitungswasser gelöst und mit 50 g Preßhefe bei 20° zur Gärung angestellt.

Nach 2 Tagen fiel die Prüfung auf Zucker im Hefefiltrat mit Fehlingscher Lösung negativ aus, und beim Polarisieren erwies sich die Maische optisch inaktiv.

Durch eine Tonzelle wurde die Maische von der Hefe abgesaugt und diese mit Wasser nachgewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde destilliert, das Destillat zur Verseifung eventuell gebildeter Ester mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und nochmals destilliert. Durch eine weitere dritte Destillation wurden 120 ccm 42,5 Vol.%iger Rohspiritus = 51 ccm reiner Alkohol erhalten. Die Fuselölbestimmung in diesem Spiritus ergab 0,577 Vol.% Fuselöl, auf absoluten Alkohol bezogen.

Versuch 47: Zum Vergleich wurde eine Maische derselben Zusammensetzung nach Zusatz von 10 ccm Hefenautolysat vergoren.

Nach 2 Tagen war kein Zucker mehr nachzuweisen. Durch Filtrieren mittels Tonzelle wurde die vergorene Maische von der Hefe getrennt und dann wie in Gärversuch 46 abdestilliert. Nach dreimaliger Destillation wurden 120 ccm 43 Vol.%iger Spiritus = 51,6 ccm reiner Alkohol erhalten. Fuselölgehalt 0,488 Vol.%. Der Zusatz von Hefenautolysat hatte also eine geringe Verminderung der Fuselölbildung zur Folge gehabt.

Herstellung des Hefenautolysats: 500 g Preßhefe wurden im Wasserbad 12 Stunden bei 55° autolysiert, dann mit 500 ccm Wasser in einen Kochkolben gespült und 30 Minuten auf dem Baboblech

gekocht. Dann wurde durch eine Tonzelle filtriert. Das Filtrat wurde mit Wasser auf 1000 ccm aufgefüllt und im Dampftopf sterilisiert.

Zur Feststellung des Trockensubstanzgehaltes wurden 10 ccm Autolysat in der Platinschale auf dem Wasserbad verdampft und der Rückstand bei 110° getrocknet, gewogen und dann verascht. 10 ccm Hefenautosylat enthielten 0,3776 g Trockensubstanz und ergaben 0,0732 g Asche.

Versuch 48: 100 g Raffinade und 10 g Leucin wurden in einem Liter Leitungswasser gelöst und mit 50 g Preßhefe bei 20° zur Gärung angestellt.

Nach 2 Tagen war kein Zucker mehr in der Maische nachzuweisen. Zur Entfernung der Hefe wurde durch eine Tonzelle filtriert, die Hefe mit Wasser nachgewaschen und die hefefreie Maische mit dem Waschwasser abdestilliert. Zur Wiedergewinnung des nicht verbrauchten Leucins wurde die entgeistete Maische in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad eingedampft. Dabei erfolgte reichliche Kristallabscheidung. Die ausgeschiedenen Leucinkristalle wurden auf der Nutsche scharf abgesaugt, zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und schließlich bei 110° getrocknet. Ausbeute 5,78 g.

Das alkoholische Destillat wurde mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und dann wie bei den vorstehenden Gärversuchen noch zweimal destilliert. Dadurch wurden 120 ccm 45,1 Vol.%iger Spiritus = 54,12 ccm reiner Alkohol erhalten. Fuselölgehalt 2,73 Vol.%.

Versuch 49: 100 g Raffinade und 10 g Leucin wurden in 1 Liter Leitungswasser gelöst, mit 10 ccm Hefenautolysat versetzt und mit 50 g Preßhefe bei 20° zur Gärung angestellt.

Nach zwei Tagen fiel die Prüfung auf unvergorenen Zucker negativ aus. Durch Filtration mittels Tonzelle wurde die Maische von der Hefe befreit und wie bei den vorstehenden Versuchen abdestilliert.

Die entgeistete Maische wurde wie im Versuch 48 behandelt und dadurch 5,93 g Leucin zurückgewonnen.

Die Alkoholausbeute nach dreimaliger Destillation betrug 120 ccm 46,7 Vol.%iger Spiritus = 56,04 ccm reiner Alkohol. Fuselölgehalt 2,62 Vol.%.

Der Zusatz von Hefenautolysat hat sowohl bei Gärversuch 47, als auch bei Versuch 49 eine geringe Verminderung der Fuselölbildung bewirkt. Der in ihm enthaltene Stickstoff hat also eine verminderte Assimilation des vorgelegten Leucins zur Folge gehabt.

VI. Beeinflussung der Fuselölbildung durch Asparaginsäure. Asymmetrische Spaltung von racemischer Asparaginsäure durch Hefegärung bei Zusatz von vitaminhaltigem Nährsubtrat. Darstellung von optisch-reiner d-Asparaginsäure.

Bei den früheren Versuchen hatte sich eine Verminderung der Fuselölausbeute in allen den Fällen ergeben, in denen außer Zucker- oder Zucker-Leucinlösung mit Gemischen von Aminosäuren, wie sie im Hefenautolysat vorliegen, vergoren worden war. Es schien von Interesse nachzuprüfen, wieweit auch eine einzelne Aminosäure, aus der der Theorie nach nicht Amylalkohol gebildet werden konnte, die Fuselölbildung beeinflußt. Für diesen Zweck wurde die bisher noch wenig untersuchte racemische Asparaginsäure verwendet.

Es zeigte sich, daß bei Vergärung von 200 g Zucker mit 100 g Hefe unter Zusatz von 5 g dieser Säure sich ein Spiritus mit 0,71 Vol.% Fuselöl ergab, während der Vergleichsversuch 46 bei Vergärung von 100 g Zucker mit 50 g derselben Hefe einen Alkohol mit nur 0,58 Vol.% Fuselöl lieferte. Es hat also merkwürdiger Weise hier durch Zusatz von einer nicht Fuselöl bildenden Aminosäure eine merkbare Steigerung der Fuselölausbeute stattgefunden. Es bleibt aber fraglich und muß Gegenstand späterer Untersuchungen bleiben, ob es sich hier nicht um ein scheinbares Plus an Fuselöl handelt, und ob nicht hier ähnliche, in Chloroform lösliche, aus Asparaginsäure selbst entstandene ölige Produkte die Bestimmung beeinflußt haben, wie dieses früher bereits F. Ehrlich[3]) bei Gärversuchen mit Asparagin festgestellt hat. Wurde neben der Asparaginsäure noch Hefenautolysat oder Malzkeimauszug hinzugefügt, so zeigten die Fuselölbestimmungen unter sonst gleichen Bedingungen einen niedrigeren Gehalt von 0,51 bezw. 0,4 Vol.% Fuselöl.

Sehr eigentümliche Verhältnisse boten sich nun dar, als in den einzelnen Gärversuchen versucht wurde, aus den vergorenen Maischen die nicht angegriffene Asparaginsäure wieder zu isolieren. Wurde nämlich Asparaginsäure mit einem Ueberschuß von reinem Zucker und Hefe vergoren, so war aus den vergorenen Lösungen trotz peinlicher Aufarbeitung überhaupt keine Asparaginsäure mehr zurückzugewinnen. Es waren also in diesem Falle sowohl das rechtsdrehende, als auch das linksdrehende Stereoisomere der Asparaginsäure gleichmäßig von der Hefe assimiliert worden.

Es entspricht der Ausfall dieses Gärversuches vollkommen den Resultaten der früher von F. Ehrlich angestellten Vergärung der racemischen Asparaginsäure, bei der ebenfalls im Gegensatz zu den

meisten anderen Aminosäuren ein symmetrischer Angriff der beiden Antipoden stattgefunden hatte.

Höchst überraschend war nun, daß bei Vergärung von je 5 g racemischer Asparaginsäure mit einem Ueberschuß von Zucker und Hefe unter Zusatz von geringen Mengen eines Hefenautolysats oder eines Malzkeimauszuges jedesmal aus der vergorenen Lösung etwa 1 g reiner, optisch aktiver d-Asparaginsäure zu isolieren war, deren spezifische Drehung annähernd mit der von E. Fischer gefundenen übereinstimmte. Es wurden hier also dieselben Gesetzmäßigkeiten gefunden, wie sie F. Ehrlich bei Vergärung des racemischen Tyrosins [35]) beobachtet hat. Auch diese Aminosäure wird ebenso wie die Asparaginsäure und das Prolin mit Zucker und Hefe für sich nur symmetrisch vergoren, indem beide optischen Modefikationen gleichmäßig von der Hefe angegriffen werden. Sind aber geringe Mengen vitaminhaltiger Nährsubtrate, wie sie in Hefen-, Malz- und Malzkeimauszügen vorliegen, gleichzeitig im Gäransatz vorhanden, so bevorzugt die Hefe bei der Assimilation hauptsächlich die natürlich vorkommende optisch aktive Komponente und läßt den Antipoden derselben zum großen Teil unangegriffen in der vergorenen Lösung zurück. Ebenso wie für das d-Tyrosin ist also hier mit den folgenden Versuchen auch für die d-Asparaginsäure eine bequeme präparative Darstellungsmethode gegeben.

Gärversuche mit racemischer Asparaginsäure.

Die folgenden Versuche wurden mit einer d-l-Asparaginsäure angestellt, die aus l-Asparaginsäure durch Racemisierung mit Baryt nach dem folgenden Verfahren hergestellt wurde: 10 g l-Asparaginsäure wurden mit 40 g Bariumhydroxyd und 500 ccm Wasser 5 Std. im Autoklaven auf 145° erhitzt. Dadurch wird ein Ueberdruck von 4 Atmosphären erreicht. Dann wurde das Barium genau mit Schwefelsäure entfernt, so daß eine kleine, durch ein doppeltes Faltenfilter abfiltrierte Probe weder mit verdünnter Schwefelsäure, noch mit Barytlösung reagierte. Vom ausgeschiedenen Bariumsulfat wurde mittels Nutsche abgesaugt, die ein mit etwas Tierkohlenpulver bestreutes gehärtetes Rundfilter enthielt. Das Filtrat wurde auf etwa 150 bis 200 ccm eingeengt und nach dem Kochen mit Tierkohle der Kristallisation überlassen. Ausbeute 6,1 g = 61%. Eine Probe wurde in 3 Mol.-Gew. Salzsäure gelöst und polarisiert. $\alpha_D = +0^0$ (l=1). Es lag also reine inaktive d-l-Asparaginsäure vor.

Versuch 50: 200 g Raffinade und 5 g d-l-Asparaginsäure wurden in 2 Ltr. Leitungswasser gelöst und mit 100 g Preßhefe bei 20° zur Gärung angestellt.

Nach 3 Tagen war mit Fehlingscher Lösung wie auch durch Polarisierung kein Zucker mehr nachzuweisen. Durch Filtrieren mittels Tonzelle wurde die vergorene Maische von der Hefe getrennt.

Die Hefe wurde mit Wasser in einem Porzellanbecher, der im kochenden Wasserbad stand, dreieinhalb Stunden ausgekocht und das Wasser nach Absaugen von der Hefe auf dem Wasserbad eingedampft. Dabei blieb ein brauner Sirup zurück, aus dem sich selbst nach tagelangem Stehen in der Kälte keine Kristalle abschieden.

Die vergorene Maische wurde destilliert, zunächst ohne jeden Zusatz, ein zweites Mal nach Zusatz von etwas Natronlauge und ein drittes Mal ohne jeden Zusatz. Dadurch wurden 340 ccm 35.2 Vol.%iger Spiritus = 119,68 ccm reiner Alkohol erhalten. Die Fuselölbestimmung in diesem Spiritus ergab 0,71 Vol.% Fuselöl. Der Chloroformauszug von dieser Bestimmung war optisch inaktiv.

Die nach der ersten Destillation entgeistete Maische wurde in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad eingedampft. Es blieb dabei ein Sirup zurück, der etwas heller aussah, als der vom Filtrat der ausgekochten Hefe. Eine Ausscheidung von Kristallen nicht verbrauchter Asparaginsäure war auch in diesem Fall, selbst nach wochenlangem Stehen in der Kälte nicht zu erreichen.

Versuch 51: 2 Liter Maische von der Zusammensetzung wie in Versuch 50 mit einem Zusatz von 10 ccm Hefenautolysat von derselben Zusammensetzung, wie in den Versuchen 47 und 49 wurden bei 20° in drei Tagen vergoren.

Durch eine Tonzelle wurde die vergorene Lösung von der Hefe abgesaugt.

Die Hefe wurde wie in Gärversuch 50 vier Stunden mit Wasser ausgekocht und der wässerige Auszug auf dem Wasserbad eingedampft. Im zurückbleibenden dunkelbraunen Sirup war keine Kristallabscheidung zu erreichen.

Destilliert wurde wie in Gärversuch 50. Nach dreimaliger Destillation wurden 340 ccm 33,5 Vol.%iger Spiritus = 113,9 ccm reiner Alkohol erhalten. Die Fuselölbestimmung in diesem Spiritus ergab 0,51 Vol.% Fuselöl.

Die nach der ersten Destillation vom Alkohol befreite Maische wurde auf dem Wasserbad zum Sirup eingedampft. Aus diesem schieden sich nach dem Erkalten Kristalle ab. Nach zweitägigem Stehen in der Kälte wurden diese abgesaugt, zunächst mit Wasser, dann mit Alkohol und schließlich mit Aether gewaschen und bei 110° getrocknet. Ausbeute 0,63 g.

Diese Kristalle sahen noch etwas gelblich aus. Sie wurden in heißem Wasser aufgelöst, mit Blutkohle gekocht und umkristallisiert, wodurch 0,55 g rein weiße Asparaginsäure zurückerhalten wurden.

Aus dem Filtrat und der Waschflüssigkeit der abgesaugten Kristalle war eine zweite Kristallisation nicht zu erreichen.

Die zurückgewonnene Asparaginsäure wurde polarimetrisch untersucht. 0,324 g wurden in 5 ccm 5%iger (d. h. in 3 Mol.-Gew.) Salzsäure gelöst. $\alpha_D = -4{,}1^0$ Sacch. $= -1{,}42^0$ (l=1).

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot -1{,}42}{1 \cdot 6{,}48} = -21{,}97^0$$

Emil Fischer[36]) fand für d-Asparaginsäure in 3 Mol.-Gew. Salzsäure gelöst den Wert $[\alpha]_D^{20} = -25{,}5^0$.

Die auf diese Weise gewonnene d-Asparaginsäure war also optisch ziemlich rein und enthielt nur noch eine geringe Menge des Racemkörpers. Der Zusatz von Hefeautolysat hatte also außer der Verminderung der Fuselölbildung auch die asymmetrische Spaltung der racemischen Asparaginsäure bewirkt. Um zu untersuchen, ob auch durch Malzkeimauszüge eine ähnliche Aktivierung der racemischen Asparaginsäure zu erreichen ist, wurden die folgenden Versuche angestellt.

Herstellung des Malzkeimauszuges: 62,5 g Malzkeime von gedarrtem Malz, das nach Pilsener Art bei niederen Temperaturen getrocknet war, wurden mit 1 Liter Wasser eingeteigt, 1 Stunde bei 50° im Wasserbad gehalten, dann 3 Stunden lang bei 62 bis 63°. Dann wurde koliert und die kolierte Lösung 3 Stunden im Dampftopf erhitzt. Der Auszug war kolloidal getrübt, ohne Bodensatz. Die Spindelung ergab 3,6° Balling. Trockensubstanz- und Aschebestimmung: 10 ccm Auszug wurden in einer Platinschale auf dem Wasserbad eingedampft und der Rückstand bei 110° getrocknet, gewogen und verascht. Es wurden 0,3074 g Trockensubstanz und in dieser 0,0296 g Asche gefunden.

Versuch 52: 100 g Raffinade, 5 g d-l-Asparaginsäure wurden in einem Liter Leitungswasser gelöst, mit 5 ccm Malzkeimauszug versetzt und mit 50 g Preßhefe bei 20° zur Gärung angestellt.

Nach 2 Tagen war kein Zucker mehr nachzuweisen. Die vergorene Lösung wurde durch eine Tonzelle von der Hefe abgesaugt und abdestilliert.

Die Spiritusausbeute nach dreimaliger Destillation wie bei Versuch 52 betrug 120 ccm 45,5 Vol%iger Spiritus = 54,6 ccm reiner Alkohol. Der Fuselölgehalt war 0,399 Vol%.

Die nach der ersten Destillation vom Alkohol befreite Maische wurde auf dem Wasserbad eingedampft. Nach längerem Stehen in der Kälte wurde die auskristallisierte Asparaginsäure abgesaugt, zunächst mit Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und bei 110° getrocknet. Ausbeute 1,27 g.

---

[36]) E. Fischer: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 2464 (1899).

Um zu untersuchen, ob das Filtrat dieser Kristalle und deren Waschflüssigkeit noch Asparaginsäure enthielten, wurden diese für sich eingedampft und die eingeengten Lösungen mit Kupfercarbonat gekocht. Nur aus der eingedampften Waschflüssigkeit der rohen Asparaginsäure schieden sich wenige blaue Kristalle der schwer löslichen Kupferverbindung der Asparaginsäure ab. Diese wurden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 110° getrocknet. Es waren auf diese Weise noch 0,21 g Kupfersalz der Asparaginsäure zu isolieren.

Die Hauptmenge der erhaltenen Asparaginsäure wurde polarimetrisch untersucht. Sie erwies sich als optisch aktiv und zwar in salzsaurer Lösung linksdrehend. 0,36 g in 5 ccm 5%iger Salzsäure gelöst zeigte die Drehung $\alpha_D = -4{,}8^0$ Sacch (l = 1).

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot -1{,}87}{1 \cdot 7{,}2} = -23{,}13^0$$

Da die Säure, wie aus der spezifischen Drehung hervorgeht, noch nicht ganz rein war, wurde sie noch einmal umkristallisiert.

Zu diesem Zweck wurden 0,9 g in Wasser gelöst, mit Kieselgur gekocht, filtriert und das Kieselgur mit heißem Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand getrocknet, wodurch 0,83 g d-Asparaginsäure gewonnen wurden. 0,36 g Substanz wurden in 5 ccm 5%iger Salzsäure gelöst und polarisiert: $\alpha_D = -5{,}2^0$ Sach. (l=1).

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot -1{,}80}{1 \cdot 7{,}2} = -25{,}06^0$$

Um noch festzustellen, ob nicht etwa in den Zellen der abgesaugten Hefe noch Asparaginsäure vorhanden war, wurde diese vier Stunden im kochenden Wasserbad mit Wasser ausgezogen, der wässerige Auszug abgesaugt und auf dem Wasserbad zum Sirup eingedampft. Nachdem nach mehreren Tagen keine Kristallabscheidung erfolgt war, wurde versucht, die möglicherweise noch darin enthaltene Asparaginsäure in Form ihres schwer löslichen Kupfersalzes abzuscheiden. Zu diesem Zweck wurde das eingedampfte Filtrat in heißem Wasser gelöst und mit etwas Kupfercarbonat versetzt, vom überschüssigen Kupfercarbonat abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Es sah schmutzig grün aus. Das Kupfersalz kristallisierte nicht aus, also enthielt der Hefenauszug keine Asparaginsäure.

Versuch 53: 100 g Raffinade, 5 g d-l-Asparaginsäure wurden in 1 Liter Leitungswasser gelöst, mit 10 ccm Malzkeimauszug versetzt und mit 50 g Preßhefe bei 20° zur Gärung angestellt.

Nach zwei Tagen war die Gärung beendet. Die Maische wurde durch eine Tonzelle von der Hefe abgesaugt und abdestilliert. Nach dreimaliger Destillation wurden 120 ccm 46,8 Vol%iger Spiritus 56,6 ccm reiner Alkohol erhalten. Die Fuselölbestimmung in diesem Spiritus ergab 0,399 Vol% Fuselöl.

Die entgeistete Lösung wurde auf dem Wasserbad eingedampft. Nach dem Erkalten wurde die auskristallisierte Asparaginsäure abgesaugt, zunächst mit Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 1,1 g.

Das Filtrat mit der Waschflüssigkeit wurde nochmals eingedampft. Da sich keine Kristalle mehr ausschieden, wurde der Sirup mit Kupfercarbonat gekocht. Es wurde jedoch nur ein grüner Sirup erhalten, der keine Kristalle des Kupfersalzes enthielt.

Die rohe Asparaginsäure (1,1 g) wurde mit Wasser und Kieselgur gekocht und umkristallisiert. Dadurch wurden 0,97 g d-Asparaginsäure erhalten. 0,36 g davon wurden in 5 ccm 5%iger Salzsäure gelöst und polarisiert: $\alpha_D = -5{,}1^0$ Sacch. (l=1).

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot -1{,}77}{1 \cdot 7{,}2} = -24{,}6^0$$

Zur vollständigen Identifizierung der erhaltenen d-Asparaginsäure wurde noch deren Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Das aus 0,3881 g getrockneter Substanz entwickelte Amoniak neutralisierte 28,9 ccm n/10 Schwefelsäure. Es sind also gefunden: 10,43% N und berechnet: 10,53% N.

Durch die optische Drehung und die Stickstoffbestimmung wurde mit Sicherheit festgestellt, daß die zurückgewonnene Substanz nur aus d-Asparaginsäure bestand.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

I. Bei der Untersuchung der verschiedenen Fuselölproben aus Melassebrennereien und mit Melassemaischen arbeitenden Preßhefefabriken erwiesen sich die Fuselöle aus den Brennereien erheblich reicher an Amylalkoholen und damit auch wesentlich wertvoller als die aus den Hefefabriken. Des weiteren wiesen die Fuselöle aus den verschiedenartig arbeitenden Betrieben auch Unterschiede im Gehalt der Amylalkoholfraktion an optisch aktivem d-Amylalkohol auf. Die Drehungen der aus den Melassebrennereien stammenden Fuselöle schwankten zwischen $-2{,}91^{0}$ und $-4{,}34^{0}$ ($l=2$), woraus sich der d-Amylalkoholgehalt zu 30,06 bis 45,04% ergibt. Bei den Fuselölproben aus Hefefabriken erreichten die gefundenen Drehungswerte nur $-1{,}77^{0}$ bis $-2{,}32^{0}$ ($l=2$), woraus der Gehalt an d-Amylalkohol zu 18,38 bis 24,12% errechnet wurde. Der stärkere Amylalkoholgehalt der Brennereifuselöle erklärt sich dadurch, daß die Hefe beim Wachstum in reinen Melassemaischen ohne oder mit nur ganz nur minimaler Stickstoffdüngung gezwungen ist, vorwiegend die Stickstoffkörper der Melasse und damit auch die Alkohole der Fuselöle hauptsächlich bildenden Aminosäuren Leucin und Isoleucin zu zersetzen, um daraus Ammoniak zum Aufbau von neuem Körpereiweiß abzuspalten. Der geringere Amylalkoholgehalt der Fuselöle aus den Hefefabriken ist bedingt durch Zusätze beträchtlicher Mengen leicht assimilierbarer Stickstoffverbindungen in Form von Ammoniaksalzen und Malzkeimen zu den gärenden Maischen. Diese Stickstoffnährstoffe werden von den wachsenden Hefezellen in erster Linie für ihren Eiweißaufbau ausgenutzt, während in diesen Fällen die Leucine der Melasse nur in bedeutend vermindertem Maße zur Assimilation kommen. Daher erklärt sich auch der höhere Gehalt an optisch aktivem d-Amylalkohol im Fuselöl der Melassebrennereien, die nur mit sehr geringen Stickstoffzusätzen zu den Maischen arbeiten und dadurch das in der Melasse besonders angereicherte Isoleucin der Hefe für ihre Stickstoffernährung besser zugänglich machen. Auf dieselben Ursachen dürfte es zurückzuführen sein, daß n-Amylalkohol, dessen Muttersubstanz, die α-Amino-n-capronsäure (Norleucin), in der Melasse nur in minimalen Mengen vorhanden sein kann, in überhaupt wahrnehmbaren, wenn auch sehr geringen Quantitäten allein im Fuselöl aus reiner Melassemaische nachgewiesen werden konnte, während die sorgfältige Destillation von Fuselölen aus Preßhefe-

fabriken, die ihre Maischen stark mit Stickstoff düngen, keinen exakten Beweis für das Vorhandensein von n-Amylalkohol lieferte.

II. Durch Zusätze von anorganischen Stickstoffverbindungen zu gärenden Melassemaischen konnten gesetzmäßige Einflüsse auf Menge und Art des gebildeten Fuselöls sowie auf die Spiritusausbeuten festgestellt werden. Zusätze von anorganischen Stickstoffverbindungen bis zu 2,5% N, bezogen auf die Menge der eingemaischten Melasse, vermindern die Fuselölbildung und erhöhen die Spiritusausbeuten. Durch eine Stickstoffgabe von 2,5% N war das Minimum der Fuselölbildung und gleichzeitig das Optimum der Alkoholbildung erzielt worden. Größere Stickstoffgaben bewirkten ein Fallen der Spiritusausbeuten und ein Steigen des Fuselölgehalts. Gärversuche mit Stickstoffgaben bis 10% N ergaben, daß eine Erhöhung der Stickstoffdosis von 2,5 bis auf 10% N eine Zunahme des Fuselölgehalts von 0,2 Vol%, auf absoluten Alkohol berechnet, bis 1,06 Vol%, und eine Verminderung der Spiritusausbeute von 48,8% bis auf 43,8 Gew.% des in Form von Melasse eingemaischten Zuckers zur Folge hatte. Diese auffallende Erscheinung war dadurch hervorgerufen worden, daß die Hefezellen von einer bestimmten Stickstoffgabe an durch das überschüssige Ammoniumsulfat eine Schädigung erleiden, die vermutlich darin besteht, daß das autolytische Ferment der Hefe, die Endotryptase, zu ungunsten der Zymase starke Förderung erfährt, wodurch der Eiweißabbau der Hefe, und damit verbunden, erhöhte Fuselöl- und verminderte Alkoholbildung in immer stärker steigendem Maße einsetzt.

III. Gärversuche von Melasse mit Stickstoffdüngung in Form von Malzkeimauszügen ergaben dieselbe Beeinflussung der Fuselölbildung wie Zusätze anorganischer Stickstoffverbindungen. Proportional der zugesetzten Stickstoffmenge nahm der d-Amylalkoholgehalt der Fuselöle ab, da die Leucine der Melasse durch die mit den Malzkeimauszügen zugesetzten anderen Aminosäuren vor der Assimilation durch die Hefe in steigendem Maße geschützt wurden. Bei der Gärung mit Lüftung, wie sie in den Preßhefefabriken üblich ist, wies bei der Vergärung der Melasse für sich der gewonnene Spiritus einen deutlich geringeren Fuselölgehalt auf, dagegen wurden bei gleichzeitigem Zusatz von Stickstoffsubstanzen nur minimale Unterschiede im Fuselölgehalt des Spiritus aus gelüfteten und ungelüfteten Maischen beobachtet. Es erwies sich bei diesen Versuchen als vollkommen gleichgültig, ob der Maische der Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat, Malzkeimauszügen oder deren Gemisch zugesetzt wurde, immer unterlag die Gärung hinsichtlich der Fuselölbildung denselben Gesetzmäßigkeiten wie bei den entsprechenden Gärversuchen ohne Lüftung. Die Spiritusausbeute war aber bei diesen Versuchen auf durchschnittlich ein Drittel der bei der Gärung ohne Lüftung erreichten Alkoholproduktion zurückgegangen, während die Hefe

um mehr als 100% der Aussaathefe zugenommen hatte. Bei starker Lüftung werden die Kohlehydrate von der Hefe in größerem Maßstab zur Bildung von Hefensubstanz (Körpereiweiß, Glykogen) verwertet, so daß nur ein relativ kleiner Teil des Zuckers zu Alkohol vergoren werden kann. Je kleiner aber die Zuckermenge ist, die der Hefe zur Vergärung zur Verfügung steht, um so geringer wird auch die Menge des entstandenen Fuselöls sein, da die Vergärung von Leucin zu Amylalkohol nur vor sich geht, wenn gleichzeitig eine entsprechende Menge Kohlehydrate zu Alkohol und Kohlensäure umgesetzt werden. Unter dem Gesichtspunkt des praktischen Gärbetriebes ist schließlich auch nicht zu verkennen, daß in den Brennereien, die Hefe herstellen, durch die starke Lüftung der Maischen infolge von Verdunstung beträchtliche Verluste an Alkohol und Fuselöl eintreten können. Die geringere Fuselölbildung läßt sich ferner noch dadurch erklären, daß infolge der intensiveren Ausnutzung der Stickstoffzusätze durch die im Sauerstoffstrom stärker wachsende Hefe weniger Leucine der Melasse sowie auch des Hefeneiweißes angegriffen werden. Außerdem kann ein Teil des ursprünglich entstandenen Amylalkohols oder seines Zwischenproduktes, des Valeraldehyds, in Gegenwart des überschüssigen Luftsauerstoffs durch oxydierende Fermente eine Oxydation zu Valeriansäure erfahren haben.

IV. Gärversuche unter Zusatz von Gemischen von mehr oder minder weitgehend autolysierter Bierhefe ergaben hinsichtlich der Fuselölausbeuten unter sich und gegenüber dem entsprechenden Versuch der Vergärung reiner Melasse für sich geringe Schwankungen. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen darauf schließen, daß zugleich mit den Leucinen in jedem Stadium der Autolyse auch soviel andere Aminosäuren durch das autolytische Ferment aus dem Hefeneiweiß abgespalten werden, daß die Hefe infolge der sonst noch vorhandenen Stickstoffquellen ihren Stickstoffbedarf nur zum Teil aus den Leucinen deckt. Bei diesen Versuchen war durchweg eine absolut schaumfreie Gärung zu beobachten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das bei der Autolyse aus den Zellen ausgetretene Hefefett zurückzuführen ist. Saccharomyces ellipseideus II und untergärige Brauereihefe bilden bei der Vergärung von Melasse weniger Fuselöl als obergärige Brennereihefe. Die Untersuchung eines Breslauer Lagerbieres auf Fuselöl ergab 0,53 Vol% Fuselöl, bezogen auf absoluten Alkohol. Das sind auf das Bier mit 3,89% Alkoholgehalt umgerechnet 0,02 Vol% = 0,17 g Fuselöl im Liter.

V. Bei der Vergärung leucinhaltiger Zuckerlösungen bleibt der Fuselölgehalt im Spiritus immer unter 4 Vol%, auf absoluten Alkohol berechnet, und erreicht nicht, wie Pringsheim früher angegeben hat, 7%. Die Fuselölbildung ist im ersten Stadium der Gärung nur ganz unbedeutend stärker als gegen Schluß der Gärung. Durch Zusatz

vitaminhaltiger Auszüge von Hefe und Malzkeimen konnte in leucinhaltigen Zuckerlösungen keine bessere Ausnutzung des Leucins erreicht werden. Offenbar waren bei der gewählten Versuchsanordnung neben den zugeführten Vitaminen mit den Auszügen soviel andersartige Aminosäuren in den Gäransatz gelangt, daß die Hefe diese vorzugsweise assimilierte und entsprechend weniger Leucin angriff.

VI. Durch Zusatz von racemischer Asparaginsäure zu gärender Zuckerlösung trat eine Erhöhung der Fuselölbildung ein, wobei es jedoch fraglich erscheint, ob nicht in Chloroform lösliche, aus der Asparaginsäure selbst entstandene ölige Produkte die Fuselölbestimmung beeinflußt haben. Bei Vergärung einer wässerigen Zucker-Asparaginsäurelösung war aus der vergorenen Maische keine Asparaginsäure zurückzugewinnen. Auf Zusatz geringer Mengen vitaminhaltiger Nährsubstrate in Form von Hefen- und Malzkeimauszügen, bevorzugt die Hefe bei der Assimilation hauptsächlich die natürlich vorkommende, optisch aktive Komponente der racemischen Asparaginsäure und läßt den Antipoden derselben zum großen Teil unangegriffen in der vergorenen Lösung zurück. Damit ist für die d-Asparaginsäure eine bequeme präparative Darstellungsmethode gegeben.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biochemie und landwirtschaftliche Technologie der Universität Breslau in der Zeit vom Sommersemester 1925 bis Sommersemester 1927 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Felix Ehrlich ausgeführt. Meinem verehrten Lehrer, der mich im gesamten Verlaufe der vorliegenden Untersuchungen jederzeit mit Rat und Hilfe freundlichst unterstützte, möchte ich nicht verfehlen, an dieser Stelle meinen ergebensten Dank auszusprechen.

LEBENSLAUF.

Geboren wurde ich, Rudolf Gerhard Otto, zu Gleiwitz OS. am 8. Mai 1900, evangelischer Konfession, als Sohn des Reichsbahnobersekretärs Bernhard Otto. Ich besuchte von Ostern 1906 bis Ostern 1907 die Vorschule der Kgl. Realschule zu Dirschau, anschließend zwei Jahre die St. Katharinen-Mittelschule in Danzig und von Ostern 1909 die Oberrealschule zu St. Petri und Pauli in Danzig und bestand daselbst am 9. Februar 1918 die Reifeprüfung.

Im Sommer-Semester 1918 studierte ich an der Technischen Hochschule zu Danzig bis zur Einberufung zum Heeresdienst allgemeine Wissenschaften. Nach meiner Entlassung trat ich im Januar 1919 zur Abteilung für Chemie über und legte die Diplom-Hauptprüfung im Dezember 1922 ab. Vom 22. August 1922 bis 30. August 1923 war ich als Chemiker in der Likörfabrik Carl Mampe, Danzig A.-G. und vom 1. Oktober 1923 bis 31. Dezember 1924 als Betriebsleiter bei der Danziger Spirituosen- und Südwein-Großhandelsgesellschaft m. b. H., Fabrik Danziger Edelliköre und Essenzen, tätig. Seit dem Sommer-Semester 1925 war ich Volontärassistent am Institut für Biochemie und landwirtschaftliche Technologie der Universität Breslau und gleichzeitig mit der Ausführung der vorliegenden Doktorarbeit beschäftigt.

Breslau, den 12. September 1927.

Buchdruckerei Leopold Freund, Breslau, Herrenstr 29-30